

**“FEDERICO II”
UNIVERSITY OF NAPLES**

**PhD Program
“Human Reproduction, Development and Growth”**

**Director
Prof. Claudio Pignata**

PhD Thesis

“Innovative therapeutic approaches in lysosomal storage disorders”

**Tutor
Prof. Giancarlo Parenti**



**Student
Dr. Simona Fecarotta**

Academic Year 2006-2007

INDEX

GENERAL INTRODUCTION

CHAPTER 1

PROJECT 1: A phase IV, multicenter, randomized, dose frequency study of the safety and efficacy of Cerezyme infusions every four weeks versus every two weeks in the maintenance therapy of patients with type I Gaucher disease. Trial CZ-011-01 supported by Genzyme corporation

- **INTRODUCTION**
- **BACKGROUND AND RATIONALE**
- **AIMS OF THE STUDY**
- **PATIENTS AND METHODS**
- **RESULTS**
- **REFERENCES**

CHAPTER 2

PROJECT 2: Innovative therapeutic approaches in mucopolysaccharidosis type 2

BACKGROUND

SECTION 1

Observational study for post-marketing evaluation of efficacy of Iduronate-2-Sulfatase Enzyme Replacement Therapy in patients with mucopolysaccharidosis type 2

- **AIM OF THE STUDY**
- **PATIENTS AND METHODS**
- **RESULTS**

SECTION 2

Preliminary results of a substrate reduction therapy in cellular models of mucopolysaccharidoses

- **AIM OF THE STUDY**
- **PATIENTS AND METHODS**
- **RESULTS**

DISCUSSION

REFERENCES

CHAPTER 3

PROJECT 3: *Efficacy and safety of treatment with N-butyl-deoxynojirimycin (NB-DNJ-miglustat) in patients with Niemann-Pick disease type C.*

INTRODUCTION

PHASE 1: Mono-centric study involving 4 patients enrolled at Department of Pediatrics, Federico II University

- **AIM OF THE STUDY**
- **PATIENTS AND METHODS**
- **RESULTS**
- **DISCUSSION**

PHASE 2: Multi-centric italian trial supported by Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA)

- **AIM OF THE STUDY**
- **PATIENTS AND METHODS**
- **RESULTS**

REFERENCES

CHAPTER 4

Attached publications about lysosomal storage disorders

Other selected papers of Dr. Simona Fecarotta, published during the PhD program

GENERAL INTRODUCTION

The treatment of lysosomal storage diseases (LSDs) represents a difficult challenge for physicians involved in the care of patients with this group of disorders. In the past, no specific therapy was available for the affected patients, and management consisted solely of supportive care and treatment of complications. During the last few years, significant progress has been made in the treatment of LSDs thanks to the improved understanding of their biochemical and molecular bases and to the availability of new technologies for the development of innovative therapeutic approaches and drugs.

LSDs are a group of diseases characterized by the lysosomal accumulation of a substrate caused by a defective function of individual lysosomal hydrolases (or of the lysosomal degradative machinery).

Lysosomes are membrane-delimited organelles, containing hydrolases responsible for the degradation of macromolecules. They are a component of a highly dynamic endocytotic system, whereby various lysosomes interact by fusion with different endocytotic organelles. Hydrolytic enzymes or macromolecules that have to be degraded are delivered to these acidified organelles by various pathways, which among others involve the endocytosis, autophagy and the direct transport across the lysosomal membrane.

A lysosomal storage disorder can be caused by the lack/deficiency of an acid hydrolase (e.g. mucopolysaccharidoses, glycoproteinoses and sphingolipidoses), by deficiencies of activator proteins, by a malfunction of lysosomal transporters (e.g. cystinosis and Salla disease), by defects in trafficking (e.g. Niemann-Pick type C), and by defects of the lysosomal membrane (e.g. Danon disease). In the multiple sulphatase deficiency activities of all sulfatases are impaired due to a defect in posttranslational modification.

The lysosomal storage disorders can be classified according to the substrate that is accumulating in the affected cells: for example glycosaminoglycans represent the main storage product in mucopolysaccharidoses, glycosphingolipids in Gaucher, Niemann-Pick, Krabbe and Fabry diseases, gangliosides in Tay-Sachs and Sandhoff diseases.

A lysosomal defect leads to accumulation of undegraded material causing cell and organ dysfunction. In order to explain how substrate accumulation results in disease many investigations in a great number of tissues and organs have been carried out over the years. From these studies it has been realized that there are many factors that play a role in the pathophysiology of lysosomal storage disorders. For example, it is well known that in Gaucher disease macrophages, activated by the storage of

glucosylceramide, release a large number of cytokines or chemokines that have inflammatory effects (Hollak et al. 1997). Moreover it was suggested that disturbance of calcium homeostasis may be a significant mechanism responsible for neuropathophysiology in acute neuronopathic Gaucher disease (Pellet et al. 2000).

Inflammatory processes seem also to play a role in the development of joint and bone disease in mucopolysaccharidoses (Simonaro et al. 2005) and recent investigations have provided evidence that inflammatory processes also contribute significantly to neurodegeneration in different LSDs (Wada et al, 2000; Jeyakumar et al, 2003).

However, although we presently do not completely understand the pathophysiology of lysosomal storage disorders, there is no doubt that accumulation of storage material is the first pathogenetic factor which leads to disease initiation and progression by triggering secondary structural and biochemical alterations.

Removal of this material should be the first goal of therapeutic strategies. To achieve this aim innovative approaches have been recently developed, as the enzyme replacement therapy (ERT), the substrate reduction therapy (SRT), the enzyme enhancement therapy (EET) through chaperone and the stem cells transplantation.

A poor experience has been reported in most cases.

The rationale of the ERT is based on increasing the activity of the defective enzyme by intra venous administration of a recombinant enzyme. This approach finds the best indication in LSDs. In fact, the administered lysosomal enzymes can be internalized by the recipient's cells, and can reach lysosomes thanks to a sophisticated system of ligands (e.g. the mannose 6-phosphate) and specific receptors. In some cell types exogenous lysosomal enzymes are taken up by additional recognition systems which bind, for example, terminal galactose (hepatocytes) or mannose residues (macrophages). The fact that several recognition systems exist has to be taken into consideration in the development of an effective enzyme replacement therapy. For example, an enzyme that should be targeted to macrophages has to be modified in order to exposure mannose residues. Interestingly, only 1–5% of the normal cellular activity is required in order to correct the metabolic defect.

For some lysosomal storage disorders such as Gaucher disease, macrophages are important therapeutic targets. Since in Gaucher disease the lipid glucosylceramide accumulates mainly in macrophages, for an effective substitution exogenously administered enzyme must be targeted to this cell type.

Since the mannose receptor plays an essential role in enzyme uptake and the native glucocerebrosidase (either isolated from placenta or produced by gene technology)

does not bear terminal mannose residues, it has to be modified. By removing some sugar residues, mannose becomes the terminal sugar, and this modified enzyme was shown to be very effective in the treatment of patients with Gaucher disease (Barton et al. 1991).

In fact, just for Gaucher disease the widest clinical experience with ERT on a considerable number of patients has been reported to date. Nevertheless, also for this disease, the optimal therapeutic protocols as the appropriate dosage of the enzyme to get the best clinical benefit (particularly in patients with complications) and the best frequency of administration to get a better quality of life, preserving the clinical benefit, have not been clarified at the moment. In this respect further studies enrolling wide sample population are needed.

Since enzyme replacement therapy has been successfully introduced for patients with Gaucher disease, and thanks to molecular biology techniques allowing a production on large scale of recombinant human enzymes, this principle of treatment has been taken into consideration for other lysosomal storage disorders as well.

Clinical trials could demonstrate the clinical benefit of this therapeutic principle in Fabry disease, mucopolysaccharidoses type I, II and VI and in Pompe disease.

Mucopolysaccharidoses (MPS) are multisystemic disorders that affect several organ systems to an individually variable degree. The extreme clinical heterogeneity seen in mucopolysaccharidoses has made it very difficult to design clinical trials with clinically relevant endpoints.

MPS II (Hunter disease) is an X-linked lysosomal storage disorder caused by a deficiency of the lysosomal enzyme iduronate-2-sulfatase (I2S). As until now an effective treatment for patients affected by MPS does not exist, a phase I/II study was recently completed in order to evaluate the safety and clinical activity of a recombinant enzyme preparation of iduronate-2-sulfatase (Muenzer et al, 2007). A phase II/III study is presently in progress and only preliminary data have been published at the moment (Muenzer et al, 2006).

Due to the limited experience and considering that a widespread knowledge of the natural course of the diseases is lacking (mainly due to the extreme rarity of these conditions), each observation, even if in a limited number of patients, could provide additional information.

Apparently, there are a few limits of enzyme replacement therapy in treating lysosomal storage disorders. The usefulness of enzyme replacement therapy is limited due to the fact that a given enzyme preparation does not have beneficial effects on all aspects of a

disorder in the same degree. For example, in mucopolysaccharidoses the enzyme preparations do not have a beneficial effect on the skeletal system, heart valve or brain. Clinical studies have shown that many symptoms of a lysosomal storage disorder, even after long-term treatment, are no more reversible. In this respect it might be possible that some limitations of enzyme replacement therapy are due to the timing of therapy, and that early therapeutic intervention may lead to a better outcome.

Additionally it has become clear that some of the clinical symptoms of lysosomal storage disorders are caused by processes secondary to the storage of the substrate, such as inflammation and apoptosis and it is not certain that enzyme replacement therapy will have any effect on these pathogenetic factors.

A further novel therapeutic option for lysosomal storage disorders consists of the application of small molecules that either inhibit a key enzyme which is responsible for substrate synthesis (substrate deprivation) or act as a chaperone to increase the residual activity of the lysosomal enzyme (enzyme enhancing therapy).

The rationale of the substrate deprivation strategy is different, and also innovative, and it represents a real biochemical manipulation of the altered metabolic pattern. Generally small molecules are able to inhibit the synthesis, and therefore the storage, of the macromolecules that accumulate in the LSDs.

Presently substrate reduction therapy represents a novel approach for the treatment of different glycosphingolipidoses. Also in this case the first experiences have been reported in the treatment of Gaucher disease by imino-sugar N-butyldeoxynojirimycin inhibition of the enzyme glucocerebrosidase. Few clinical trial showed the efficacy of such treatment in adult patients with mild or moderate Gaucher disease.

A therapeutic approach based on the SRT may be considered in different LSDs. The main advantage of this kind of treatment in LSDs with central nervous system involvement, could depend on the ability of the small molecules to overcome the blood- brain-barrier, with possible efficacy on the neurological symptoms.

As glucosylceramide represents the precursor of several glycosphingolipids such as globosides and gangliosides, N-butyldeoxynojirimycin has been also considered as a treatment option for patients with GM1-or GM2-gangliosidoses. Bembi et al. (2006) investigated the clinical efficacy of N-butyldeoxynojirimycin in two patients with infantile Tay–Sachs disease (B variant of GM2-gangliosidosis), showing that the enzyme inhibitor could not arrest the progressive clinical deterioration.

A SRT with N-butyldeoxynojirimycin has been hypothesized also for the treatment of Niemann–Pick disease type C (NP-C) (Lachmann et al 2004) as it has been suggested

that the defect in lipid trafficking within the endosomal-lysosomal system involve glycosphingolipids and that the glycosphingolipids storage has a central role in the pathogenesis of neuronal damage.

In studies of murine and feline models of NPC disease, reduction of glycosphingolipids accumulation with N-butyldeoxynojirimycin treatment delayed the onset of neurological symptoms and increased life-span (Zervas et al, 2001)

A multi-centric international trial to analyze the efficacy of N-butyldeoxynojirimycin in NPC patients (adults and children) is presently ongoing (Patterson et al, 2007). Due to the poor experience collected, the promising preliminary results need to be evaluated on a wide population of NPC patients.

Recently SRT based strategy has been proposed as a potential therapeutic option for the treatment of some types of mucopolysaccharidoses, particularly in cases showing residual enzyme activity. The experience of SRT in mucopolysaccharidoses is extremely poor, being limited to the preliminary evaluation of two molecules, genistein and the rhodamine B in cellular and animal models.

A significant decrease of the glycosaminoglycans (GAGs) concentration has been shown in fibroblasts from patients with MPS I, MPS II, MPS IIIA and IIIB after incubation with genistein (Piotrowska E et al, 2006).

Additionally MPS IIIA mouse models treated with rhodamine B showed an evident reduction of the concentration of GAGs in urines, liver and brain, other than the normalization of the body weight and liver size (Roberts et al, 2006).

These promising results need further experimental confirmations before clinical trials could start.

Finally further therapeutic options based on the combination of ERT and SRT should be taken into consideration for the treatment of LSDs with the aim of obtaining additional effects on somatic and neurological symptoms of the disease.

REFERENCES

- Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, Mankin HJ, Murray GJ, Parker RI, ArgoV CE et al (1991) Replacement therapy for inherited enzyme deficiency-macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med* 324:1464–1470
- Bembi B, Marchetti F, Guerci VI, Ciana G, Addobbati R, Grasso D, Barone R, Cariati R, Fernandez-Guillen L, Butters T, Pittis MG (2006) Substrate reduction therapy in the infantile form of Tay–Sachs disease. *Neurology* 66:278–280
- Elstein D, Hollak C, Aerts JM, van Weely S, Maas M, Cox TM, Lachmann RH, Hrebicek M, Platt FM, Butters TD, Dwek RA, Zimran A (2004) Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, N-butyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 27:757–766
- Heitner R, Elstein D, Aerts J, Weely S, Zimran A (2002) Lowdose N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) for type I Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 28:127–133
- Jeyakumar M, Butters TD, Cortina-Borja M, Hunnam V, Proia RL, Perry VH, Dwek RA, Platt FM (1999) Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6388–6393
- Lachmann RH, Te Vruchte D, Lloyd-Evans E, Reinkensmeier G, Sillence DJ, Fernandez-Guillen L, Dwek RA, Butters TD, Cox TM, Platt FM (2004) Treatment with miglustat reverses the lipid-traYcking defect in Niemann–Pick disease type C. *Neurobiol Dis* 16:654–658
- Muenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, Vellodi A, Martin R, Ramaswami U, Gucsavas-Calikoglu M, Vijayaraghavan S, Wendt S, Puga AC, Ulbrich B, Shinawi M, Cleary M, Piper D, Conway AM, Kimura A. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genet Med*. 2006;8(8):465-73.
- Muenzer J, Gucsavas-Calikoglu M, McCandless SE, Schuetz TJ, Kimura A. A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Mol Genet Metab*. 2007;90(3):329-37.
- Patterson MC, Vecchio D, Prady H, Abel L, Wraith JE. Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol*. 2007;6(9):765-72.
- Pelled D, Shogomori H, Futerman AH (2000). The increased sensitivity of neurons with elevated glucocerebroside to neurotoxic agents can be reversed by imiglucerase. *J Inherit Metab Dis* 23:175–184
- Simonaro CM, D'Angelo M, Haskins ME, Schuchman EH (2005). Joint and bone disease in mucopolysaccharidoses VI and VII: identification of new therapeutic targets and biomarkers using animal models. *Pediatr Res* 57:701–707

Wada R, TiVt CJ, Proia RL (2000) Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10954–10959

Zervas M, Somers KL, Thrall MA, Walkley SU (2001) Critical role for glycosphingolipids in Niemann–Pick disease type C. *Curr Biol* 11:1283–1287

CHAPTER 1

PROJECT 1

“A phase IV, multicenter, randomized, dose frequency study of the safety and efficacy of Cerezyme infusions every four weeks versus every two weeks in the maintenance therapy of patients with type I Gaucher disease”.

Trial CZ-011-01 supported by Genzyme corporation

INTRODUCTION

BACKGROUND AND RATIONALE

Background

Gaucher disease is the most prevalent lysosomal storage disease. It is a rare autosomal recessive inherited disorder characterized by decreased levels of the enzyme glucocerebrosidase (EC.3.2.1.45), a lysosomal hydrolase involved in the stepwise degradation of glycosphingolipids. The disease is caused by mutations in the human glucocerebrosidase gene (GBA). Due to the enzymatic deficiency glucocerebroside accumulates in the lysosomal of macrophages creating engorged Gaucher cells which are the hallmark of the disease. These lipid-laden cells displace normal, health cells, mainly in the bone marrow compartment, liver, spleen and sometimes in the lungs. The clinical manifestations of the disease are, therefore, multisystemic and include anemia, thrombocytopenia, hepatosplenomegaly and skeletal complications such as bone pain, bone lesions, cortico-medullary infarctions, medullary expansions, osteopenia, osteonecrosis, avascular necrosis and pathological fractures. In some patients an overt lung involvement may occur. A neurological involvement may occur in patients with severe mutations. A clinical classification in three main types of Gaucher disease based on clinical characteristics was first published in 1962 and was based on the presence or absence of neurological signs and rate of progression of these findings. The most

common is type I Gaucher disease (chronic non neuronopathic form) which may develop at any age and has no neurological involvement. Type I Gaucher disease has an incidence of 1 in 40,000 to 60,000 in the general population and 1 in 450 in the Ashkenazi Jewish population. Type 2 Gaucher disease (acute neuronopathic Gaucher disease) is less frequent and has no ethnical predilection. It is characterized by acute neurological involvement with rapid progression of symptoms and early age at onset. Type 3 Gaucher disease is characterized by a chronic neuronopathic involvement. However it has become increasingly clear that the phenotypes of Gaucher disease represent a continuum which ranges from a phenotype with few signs or laboratory manifestations to the most severe congenital Gaucher disease. In the last 15 years enormous progress has been made regarding therapy of type I Gaucher disease. Effective enzyme replacement therapy of type I Gaucher disease, based on chronic intravenous administration of mannose-terminated recombinant human glucocerebrosidase, has been available since 1990 and has been applied in several thousand patients without serious adverse effects. Enzyme replacement therapy has a sure efficacy on non neurological symptoms of Gaucher disease. Actually, the treatment of patients with type 1 Gaucher with enzyme replacement therapy (ERT) is usually characterized by a dramatic improvement of haematological and visceral symptoms. It is estimated that approximately half of type I Gaucher disease patients will have sufficient signs and symptoms to warrant treatment, by regular intravenous administrations of ERT.

Rationale

Despite a long-standing experience of enzyme replacement therapy of Gaucher disease has been reached, the optimal therapeutic regimen of Cerezyme and dosage is not clear, yet. The majority of the studies have used a dosage ranging between 30 to 60 U/kg per month, with an administration frequency of an infusion every two weeks, but in other studies lower dosage with higher frequency have also been used.

This study has the potential to demonstrate improved quality of life and convenience with no deterioration in the clinical variables and no increase in frequency or severity of adverse experiences for patients with Gaucher disease who are treated with the same monthly dosage of Cerezyme with infusions every 4 weeks versus every 2 weeks.

AIMS OF THE STUDY

- The primary objective of this study is to assess the safety and efficacy of two different dosing frequencies of Cerezyme in patients with Type 1 Gaucher disease who are currently being treated with Cerezyme.
- The secondary objective is to assess quality of life in the 2 groups.

PATIENTS AND METHODS

This is a phase IV, multicenter, randomized trial to compare the safety and efficacy of two dosing frequencies of Cerezyme in patients who are currently treated with Cerezyme. Patients were to continue to receive the same total 4-week dose that they were receiving prior to study enrolment, however, they are randomized to receive either their total 4-week dose in two infusions, one infusion every 2 weeks (hereafter referred as “q2”) or their total 4-week dose in one infusion every 4 weeks (hereafter referred as “q4”). The study duration is 24 months with an interim analysis of the data after all patients reach 12 months in the study.

PATIENT POPULATION AND SELECTION

Up to 25 study centres worldwide participated in this clinical trial.

130 patients have been enrolled and screened for eligibility and for establishing baseline parameters. If all inclusion/exclusion criteria were satisfied the patient have been randomized with a scheme that ensured a 2:1 balance between the two treatment groups (q4:q2) at each site.

Patients could be included if they provided written informed consent; they had a confirmed diagnosis of Gaucher disease with a documented deficiency of glucocerebrosidase by enzyme assay; they had been genotyped or will have genotyping within 3 months of study enrolment; they had been treated with Cerezyme for at least 2 years prior to study enrolment and had been on a stable dose of between 20-60U/kg every 2 weeks for at least 6 months prior to study enrolment; they are at least 18 years old; they had a hemoglobin value of > 11.0 g/dL for women and > 12.0 g/dL for men and a platelet count of $> 100,000$ mm³; they had a liver volume is < 1.8 x normal confirmed by MRI or CT within 6 months of randomization and a spleen volume is < 10 x normal confirmed by MRI or CT within 6 months of randomization; they had a serum creatinine < 2.0 mg/dL, an AST and ALT < 2 x upper limit of normal and a total bilirubin < 2.0 x upper limit of normal. Additionally female patients of childbearing potential had to have a negative pregnancy test within 2 weeks prior to randomization into the study.

Patients were excluded if they had evidence of neurological or pulmonary involvement; they showed current or prior bleeding varices or liver infarction requiring hospitalization; they had new evidence of pathologic bone fractures, medullary

infarctions, lytic lesions or avascular necrosis secondary to Gaucher disease, confirmed by skeletal evaluation within 6 months of randomization. Additionally they were excluded if they had showed a bone crisis (defined as pain with acute onset which requires immobilization of the affected area, narcotics for relief of pain and may be accompanied by periosteal elevation, increased white cell count, fever or debilitation of > 3 days) within 12 months of randomization and they had a clinically significant disease (with the exception of symptoms relating to Gaucher disease), including clinically significant cardiovascular, hepatic, immunologic, pulmonary, neurological or renal disease, or other medical conditions, serious intercurrent illness, or extenuating circumstances that, in the opinion of the Investigator, would preclude participation in the trial or potentially decrease survival.

Patients could not receive any other investigational product throughout the course of the study and were excluded if they had received an investigational drug within 30 days of the start of their participation in this trial.

102 patients were randomized to one of two treatment arms (65 to q4, 37 to q2). Of these, 95 received at least one dose as part of the study and are included in the intention to treat population (62 q4, 33 q2).

Approximately 85% of patients have completed the study through Month 12; only 32% of patients have completed the study through Month 24 at this point.

Reasons for discontinuing the study prior to Month 12 were generally similar across treatment arms (tab 14.1-1).

Patient demographics were similar in the two groups of treatment (table 14.1-2). Age of included patients ranged between 18 and 82 years.

Three patients have been enrolled at the Department of Pediatrics of “Federico II” University of Naples.

Of these, one patient was randomized in the control arm of treatment and completed the study through Month 24. Two patients were randomized in the q4 arm: one completed the study through Month 6, due to clinical failure, the other discontinued the study immediately after the screening, due to a bad compliance.

STUDY PROCEDURES AND FLOW CHART

The study procedures and the timing are summarized in Table 1.

RESULTS

The primary study endpoint is the clinical success rate at 24 months. Primary Efficacy has been evaluated according to clinical success/clinical failure criteria as follows:

Patients are considered to be a clinical success if ALL of the following are met:

- The patient's hemoglobin does not fall more than 1.25g/dL for women or 1.5 g/dL for men below the patient's baseline value.
- The patient's platelet count does not fall more than 25% below the patient's baseline value or does not fall below 80,000 mm³.
- The patient's liver and spleen volumes are not greater than 20% above the patient's baseline value.
- The patient has no evidence of progression of bone disease, including no incidence of pathologic fractures, medullary infarctions, lytic lesions or avascular necrosis.
- The patient has had no bone crises during the study.

Patients are considered a clinical failure if ANY of the following are met:

- The patient's hemoglobin falls more than 1.25 g/dL for women or 1.5 g/dL for men below the patient's baseline value and this value is the same or lower when repeated twice at 2-week intervals.
- The patient's platelet count falls below 25% of the patient's baseline value, or falls below 80,000 mm³ and this value is the same or lower when repeated twice at 2-week intervals.
- The patient's liver or spleen volume(s) are greater than 20% above the patient's baseline value and these values are still greater than 20% when repeated within 4-weeks.
- The patient has evidence of progression of bone disease, including an incidence of a pathologic fracture, medullary infarction, lytic lesion, and /or avascular necrosis.
- The patient has had a bone crisis during the study.

Secondary efficacy consist of the evaluation of quality of life, including eight subscales and two composite scores, as measured by the SF-36. Secondary efficacy has been measured in terms of the quality of life in the two study groups.

SAFETY

Safety has been assessed by the changes in laboratory values, physical examinations and the incidence of reported adverse experiences.

12-month interim analysis

This trial is in progress at the moment.

A 12-month interim analysis, designed to examine the clinical success rate at 12 months, have been completed. Whole results are not yet available and will be presented by the Sponsor at the end of January 2008.

According to the protocol, patients experiencing a clinical failure event were to have the event confirmed within a certain timespan that fell prior to the next study visit. As only about one third of clinical features returned to the clinic to confirm the failure, the data was analyzed in two ways.

First, the time to first clinical failure (i.e. unconfirmed) was analyzed. This data is presented in figure 14.2.1-2.

Second, the time to first confirmed clinical failure (using data from the next study visit to confirm failure) was analyzed. This data is presented in figure 14.2.3-2.

From these figures, one can see that the q2 arm performed significantly better than q4 arm in each analysis. One can also infer that the definition of clinical failure was most likely too lenient as many of the initial failures are unconfirmed (i.e., patients are better by the next visit). This is true in both study arms.

For the final study analysis the sponsor Genzyme is interested in determining whether there is a subset of patients who are likely to perform well on q4 as the regimen provides for a more convenient infusion schedule.

Table 1 Schedule of Study Assessments

	Screening		At Every Infusion	3,9,15,21 Months (telephone call)	6 and 18 Months	12 Months	24 Months	At Study Discontinuation
	Within 6 Months Prior to Randomization	Within 4 Weeks Prior to Randomization						
Patient Signs Informed Consent Form Prior to ANY Study-Related Procedures								
PHYSICAL/WELL-BEING								
Demographics		X						
Medical/Surgical History		X						
Cerezyme® Infusion History		X						
Physical Examination		X			X	X	X	X
Weight		X	X					
Cerezyme® Dose			X		X	X	X	X
Adverse Experience Assessment			X	X	X	X	X	X
Concomitant Medications ^A		X		X	X	X	X	X
LABORATORY								
Genotyping	X ^B							
Hemoglobin		X		X	X	X	X	X
Platelets		X		X	X	X	X	X
Chemistry Panel ^C (if Ca is below normal, measure Vitamin D)		X					X	X
Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP)		X		X	X	X	X	X
Angiotensin Converting Enzyme (ACE)		X		X	X	X	X	X
Chitotriosidase		X		X	X	X	X	X
Cerezyme® Antibody	X ^D							X
Pregnancy Test (serum β-hCG), if applicable		within 2 weeks						
SKELETAL								
Gaucher Assessments (Mobility, Bone Pain, Bone Crisis)		X		X	X	X	X	X
X-ray: AP view of entire femora and lateral view of spine	X					X	X	X ^E
MRI (coronal; T1 and T2-weighted) of entire femora ^F	X					X	X	X ^E
VISCERAL								
Spleen Volume (Volumetric MRI or CT)	X				X	X	X	X ^E
Liver Volume (Volumetric MRI or CT)	X				X	X	X	X ^E
QUALITY OF LIFE								
Quality of Life Questionnaire (SF-36)		X			X	X	X	X

TABLE 14.1-1
SUMMARY OF PATIENT DISPOSITION
ALL PATIENTS ENROLLED

Category	Summary Statistic	Q2 (INFUSIONS EVERY 2 WK)	Q4 (INFUSIONS EVERY 4 WK)	Overall
Total Number of Patients Enrolled	N	NA	NA	130
Number of Patients Randomized	n (%)	37	65	102 (78.5)
Number of Patients in the ITT Population	n (%)	33	62	95 (73.1)
Total Number of Patients in the ITT Population	N	33	62	95
Completion Status Through 12 Months				
Number of Patients Completing	n (%)	29 (87.9)	52 (83.9)	81 (85.3)
Number of Patients Discontinuing	n (%)	4 (12.1)	10 (16.1)	14 (14.7)
Principal Reason for Discontinuation				
Adverse Events	n (%)	1 (3.0)	3 (4.8)	4 (4.2)
Non-Compliant	n (%)	1 (3.0)	0	1 (1.1)
Wishes to Withdraw	n (%)	0	1 (1.6)	1 (1.1)
Lost to Follow Up	n (%)	0	0	0
Other	n (%)	2 (6.1)	6 (9.7)	8 (8.4)

TABLE 14.1-1
SUMMARY OF PATIENT DISPOSITION
ALL PATIENTS ENROLLED

Category	Summary Statistic	Q2 (INFUSIONS EVERY 2 WK)	Q4 (INFUSIONS EVERY 4 WK)	Overall
Study Completion Status				
Number of Patients Completing	n (%)	10 (30.3)	20 (32.3)	30 (31.6)
Number of Patients Discontinuing	n (%)	6 (18.2)	19 (30.6)	25 (26.3)
Principal Reason for Discontinuation				
Adverse Events	n (%)	1 (3.0)	5 (8.1)	6 (6.3)
Non-Compliant	n (%)	1 (3.0)	0	1 (1.1)
Wishes to Withdraw	n (%)	0	1 (1.6)	1 (1.1)
Lost to Follow Up	n (%)	0	0	0
Other	n (%)	4 (12.1)	13 (21.0)	17 (17.9)

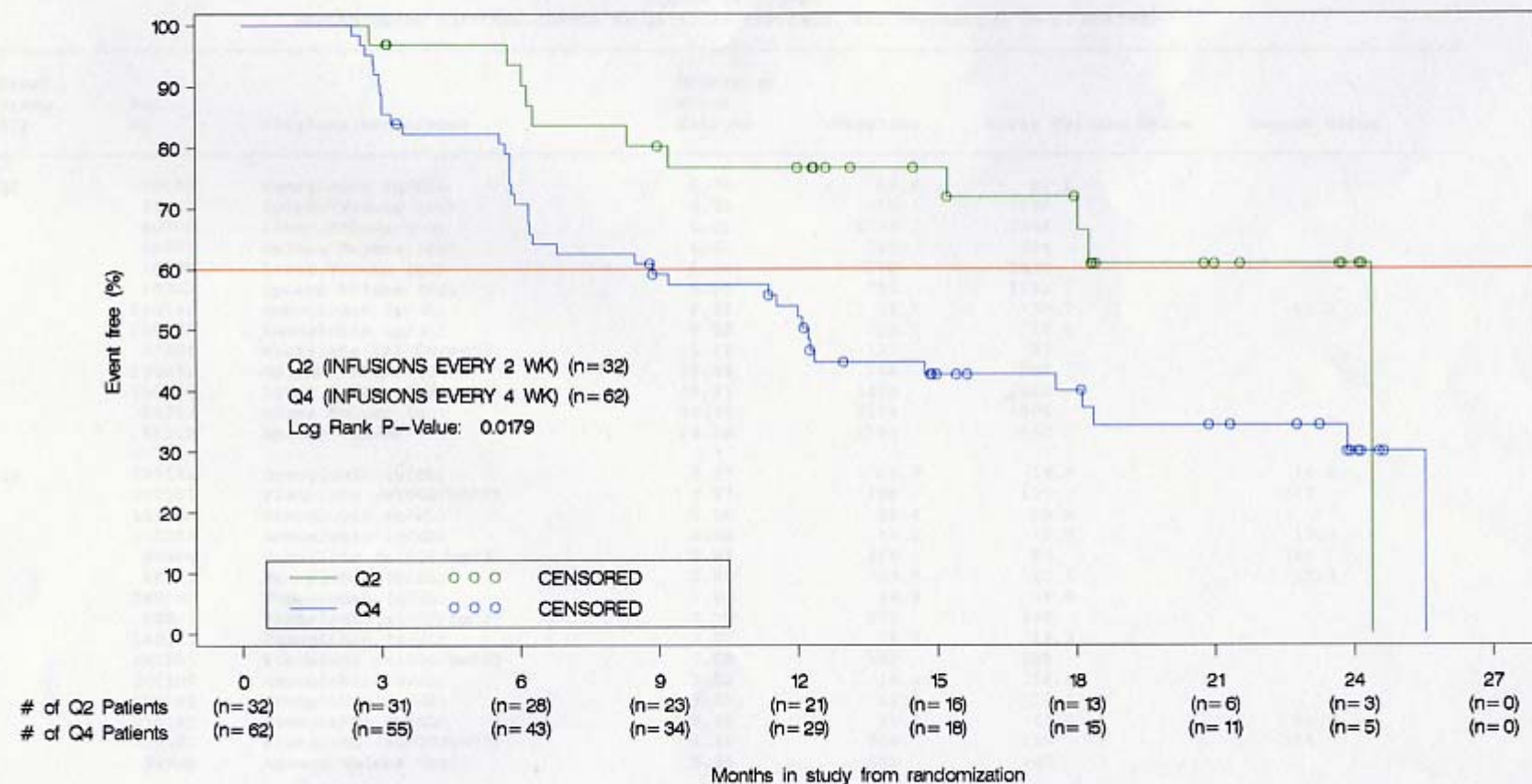
TABLE 14.1-2
SUMMARY OF PATIENT DEMOGRAPHICS
ITT POPULATION

Parameter	Summary Statistic	Q2 (INFUSIONS EVERY 2 WK) (N=33)	Q4 (INFUSIONS EVERY 4 WK) (N=62)	Overall (N=95)
Gender				
Male	n (%)	20 (60.6)	28 (45.2)	48 (50.5)
Female	n (%)	13 (39.4)	34 (54.8)	47 (49.5)
Race				
Jewish - Ashkenazi	n (%)	17 (51.5)	29 (46.8)	46 (48.4)
Jewish - Sephardic	n (%)	0	0	0
Caucasian, Non-Jewish	n (%)	14 (42.4)	29 (46.8)	43 (45.3)
African American/Caribbean	n (%)	0	0	0
Hispanic	n (%)	1 (3.0)	2 (3.2)	3 (3.2)
Asian	n (%)	0	0	0
American Indian	n (%)	0	0	0
Other	n (%)	1 (3.0)	2 (3.2)	3 (3.2)
Age at Baseline (years) [1]				
	n	33	62	95
	Mean	44.8	47.8	46.8
	Median	43.0	48.0	47.0
	Std. Dev.	17.40	14.47	15.53
	Min., Max.	19, 82	18, 78	18, 82

[1] Baseline is defined as date of randomization.

Protocol No: CZ-011-01

FIGURE 14.2.1-2
KAPLAN-MEIER SURVIVAL CURVES OF CLINICAL EFFICACY
ITT POPULATION (0-24 MONTHS)



Note: Neither success nor failure could be ascertained for a subset of ITT patients. As a result, 1 Q2 patient is not included in the figure.

FIGURE 14.2.1-2
KAPLAN-MEIER SURVIVAL CURVES OF CLINICAL EFFICACY: ITT POPULATION (0-24 MONTHS)

Treat. Group [1]	Pat. ID	Clinical Assessment	Months at First Failure	Baseline	First Failure Value	Repeat Value
Q2	80102	Hemoglobin (g/dL)	2.76	13.9	12.2	
	51413	Spleen Volume (cc)	5.75	695	839	
	80707	Liver Volume (cc)	6.05	1773	2364	
	80707	Spleen Volume (cc)	6.05	255	334	
	10505	Liver Volume (cc)	6.14	2270	2826	
	10303	Spleen Volume (cc)	6.28	701	1141	
	210101	Hemoglobin (g/dL)	8.31	11.7	10.2	11.0
	110403	Hemoglobin (g/dL)	9.20	12.7	11.4	
	20404	Platelets (x1000/mm ³)	15.21	122	87	
	190202	Spleen Volume (cc)	18.04	744	967	
	150605	Liver Volume (cc)	18.27	1423	1828	
	51312	Liver Volume (cc)	24.38	2069	2906	
	51312	Spleen Volume (cc)	24.38	1294	1660	
Q4	190101	Hemoglobin (g/dL)	2.37	16.3	14.4	16.3
	190101	Platelets (x1000/mm ³)	2.37	198	137	127
	150504	Hemoglobin (g/dL)	2.56	15.4	13.9	
	150101	Hemoglobin (g/dL)	2.66	14.5	12.7	13.3
	80606	Platelets (x1000/mm ³)	2.83	165	83	140
	40201	Hemoglobin (g/dL)	2.86	14.2	12.3	12.7
	240202	Hemoglobin (g/dL)	2.96	16.9	14.6	
	90202	Platelets (x1000/mm ³)	2.99	212	148	
	140903	Hemoglobin (g/dL)	3.02	15.8	13.3	
	140903	Platelets (x1000/mm ³)	3.02	182	125	
	201106	Hemoglobin (g/dL)	3.02	16.6	14.9	
	270302	Hemoglobin (g/dL)	3.22	12.8	11.2	
	120101	Hemoglobin (g/dL)	3.48	15.1	13.3	15.8
	120101	Platelets (x1000/mm ³)	3.48	214	119	156
	51918	Spleen Volume (cc)	5.55	535	747	

* Treat.=Treatment; Pat.=Patient

[1] Q2=Infusions every 2 weeks; Q4=Infusions every 4 weeks

Protocol No: CZ-011-01

FIGURE 14.2.1-2
KAPLAN-MEIER SURVIVAL CURVES OF CLINICAL EFFICACY: ITT POPULATION (0-24 MONTHS)

Treat. Group [1]	Pat. ID	Clinical Assessment	Months at First Failure	Baseline	First Failure Value	Repeat Value
Q2	80102	Hemoglobin (g/dL)	2.76	13.9	12.2	
	51413	Spleen Volume (cc)	5.75	695	839	
	80707	Liver Volume (cc)	6.05	1773	2364	
	80707	Spleen Volume (cc)	6.05	255	334	
	10505	Liver Volume (cc)	6.14	2270	2826	
	10303	Spleen Volume (cc)	6.28	701	1141	
	210101	Hemoglobin (g/dL)	8.31	11.7	10.2	11.0
	110403	Hemoglobin (g/dL)	9.20	12.7	11.4	
	20404	Platelets (x1000/mm ³)	15.21	122	87	
	190202	Spleen Volume (cc)	18.04	744	967	
	150605	Liver Volume (cc)	18.27	1423	1828	
	51312	Liver Volume (cc)	24.38	2069	2906	
	51312	Spleen Volume (cc)	24.38	1294	1660	
Q4	190101	Hemoglobin (g/dL)	2.37	16.3	14.4	16.3
	190101	Platelets (x1000/mm ³)	2.37	198	137	127
	150504	Hemoglobin (g/dL)	2.56	15.4	13.9	
	150101	Hemoglobin (g/dL)	2.66	14.5	12.7	13.3
	80606	Platelets (x1000/mm ³)	2.83	165	83	140
	40201	Hemoglobin (g/dL)	2.86	14.2	12.3	12.7
	240202	Hemoglobin (g/dL)	2.96	16.9	14.6	
	90202	Platelets (x1000/mm ³)	2.99	212	148	
	140903	Hemoglobin (g/dL)	3.02	15.8	13.3	
	140903	Platelets (x1000/mm ³)	3.02	182	125	
	201106	Hemoglobin (g/dL)	3.02	16.6	14.9	
	270302	Hemoglobin (g/dL)	3.22	12.8	11.2	
	120101	Hemoglobin (g/dL)	3.48	15.1	13.3	15.8
	120101	Platelets (x1000/mm ³)	3.48	214	119	156
	51918	Spleen Volume (cc)	5.55	535	747	

* Treat.=Treatment; Pat.=Patient

[1] Q2=Infusions every 2 weeks; Q4=Infusions every 4 weeks

Version: 16:14 / 04AUG2006

FIGURE 14.2.1-2
KAPLAN-MEIER SURVIVAL CURVES OF CLINICAL EFFICACY: ITT POPULATION (0-24 MONTHS)

Treat. Group [1]	Pat. ID	Clinical Assessment	Months at First Failure	Baseline	First Failure Value	Repeat Value
Q4	30101	Hemoglobin (g/dL)	5.68	14.5	11.9	
	40302	Liver Volume (cc)	5.78	1264	1520	
	110102	Hemoglobin (g/dL)	5.78	14.1	12.5	
	220404	Spleen Volume (cc)	5.78	644	899	
	50409	Liver Volume (cc)	5.82	1182	1528	
	100101	Platelets (x1000/mm ³)	5.88	153	113	
	50910	Liver Volume (cc)	6.18	1432	1842	
	50910	Spleen Volume (cc)	6.18	614	853	
	180303	Spleen Volume (cc)	6.18	750	912	
	40504	Hemoglobin (g/dL)	6.21	13.2	11.9	
	230202	Platelets (x1000/mm ³)	6.28	428	312	387
	30404	Platelets (x1000/mm ³)	6.80	173	124	
	30303	Hemoglobin (g/dL)	8.48	13.3	11.8	
	140702	Hemoglobin (g/dL)	8.87	15.1	12.9	
	140702	Platelets (x1000/mm ³)	8.87	380	282	
	220201	Platelets (x1000/mm ³)	9.20	336	242	312
	190404	Spleen Volume (cc)	11.37	307	378	
	51817	Hemoglobin (g/dL)	11.53	12.2	9.7	
	51817	Platelets (x1000/mm ³)	11.53	133	55	
	51615	Spleen Volume (cc)	11.99	1582	2012	
	51005	Hemoglobin (g/dL)	12.09	11.9	10.1	
	110201	Spleen Volume (cc)	12.22	341	459	
	100707	Spleen Volume (cc)	12.25	254	306	
	51514	Liver Volume (cc)	12.35	1672	2090	
	100202	Liver Volume (cc)	14.72	1551	1949	
	50504	Liver Volume (cc)	17.54	1783	2284	
	150403	Liver Volume (cc)	18.14	1499	1863	
	80404	Spleen Volume (cc)	18.37	171	229	
	50201	Spleen Volume (cc)	23.85	237	350	

* Treat.=Treatment; Pat.=Patient

[1] Q2=Infusions every 2 weeks; Q4=Infusions every 4 weeks

Protocol No: CZ-011-01

Page 3 of 3

FIGURE 14.2.1-2
KAPLAN-MEIER SURVIVAL CURVES OF CLINICAL EFFICACY: ITT POPULATION (0-24 MONTHS)

Treat. Group [1]	Pat. ID	Clinical Assessment	Months at First Failure	Baseline	First Failure Value	Repeat Value
Q4	20203	Spleen Volume (cc)	25.53	284	440	

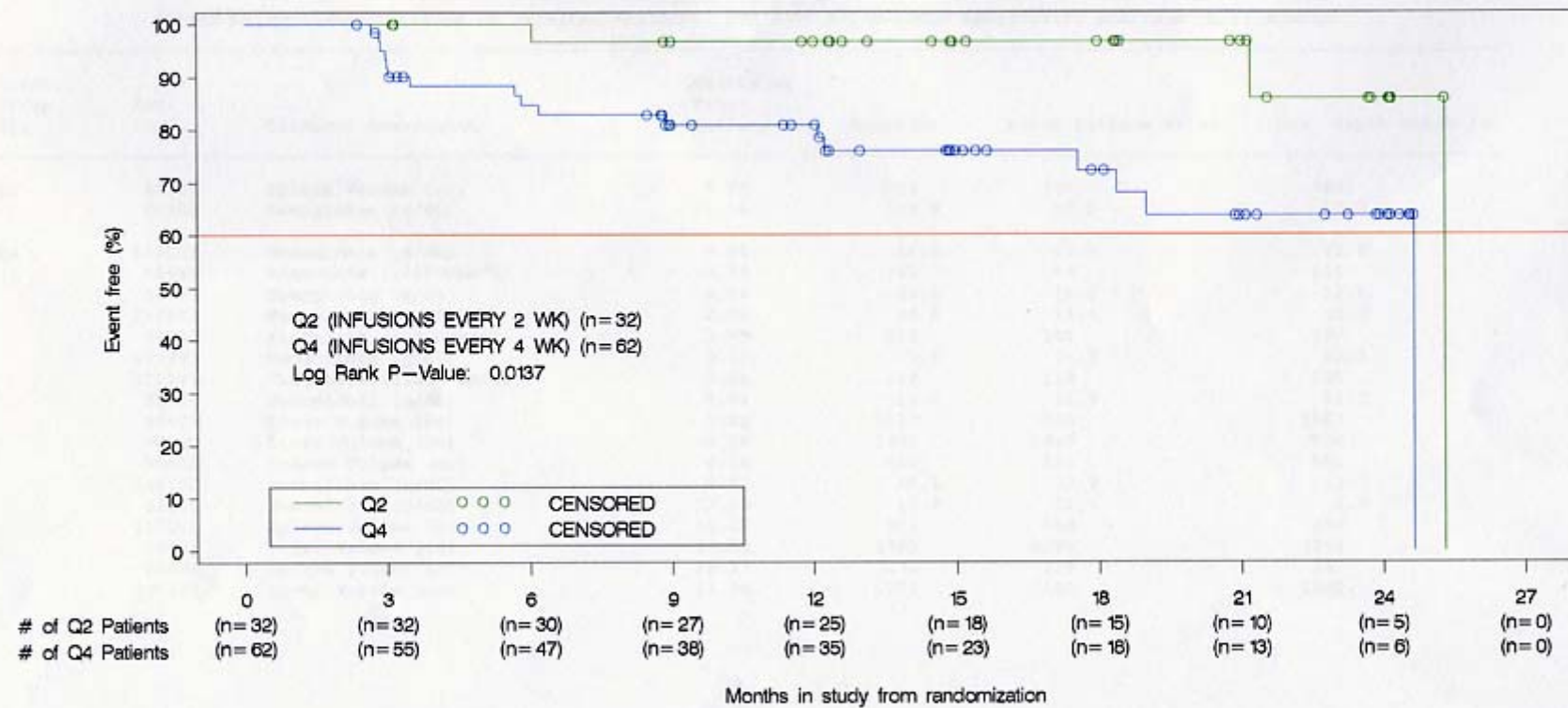
* Treat.=Treatment; Pat.=Patient

[1] Q2=Infusions every 2 weeks; Q4=Infusions every 4 weeks

Version: 16:14 / 04AUG2006

Protocol No: CZ-011-01

FIGURE 14.2.3-2
KAPLAN-MEIER SURVIVAL CURVES OF CLINICAL EFFICACY
ITT POPULATION-COVLF SENSITIVITY ANALYSIS (0-24 MONTHS)



* COVLF= Confirmed organ volume and lab failures (organ volume and lab values are confirmed using assessment at the following visit)

Note: Neither success nor failure could be ascertained for a subset of ITT patients. As a result, 1 Q2 patient is not included in the figure.

Note: Patients experiencing a spleen or liver failure at their last assessment are not treated as failures because they do not have an opportunity for a repeat assessment. These patients are thus treated as not having met the endpoint and are censored.

Protocol No: CZ-011-01

FIGURE 14.2.3-2
KAPLAN-MEIER SURVIVAL CURVES OF CLINICAL EFFICACY: ITT POPULATION-COVLF SENSITIVITY ANALYSIS (0-24 MONTHS)

Treat. Group [1]	Pat. ID	Clinical Assessment	Months at First Failure	Baseline	First Failure Value	Next Visit Value [2]
Q2	80707	Spleen Volume (cc)	6.05	255	334	364
	80102	Hemoglobin (g/dL)	21.19	13.9	12.2	12.3
Q4	150101	Hemoglobin (g/dL)	2.66	14.5	12.7	12.6
	80606	Platelets (x1000/mm ³)	2.83	165	83	111
	40201	Hemoglobin (g/dL)	2.86	14.2	12.3	12.5
	240202	Hemoglobin (g/dL)	2.96	16.9	14.6	15.3
	90202	Platelets (x1000/mm ³)	2.99	212	148	139
	140903	Hemoglobin (g/dL)	3.02	15.8	13.3	13.3
	120101	Platelets (x1000/mm ³)	3.48	214	119	142
	30101	Hemoglobin (g/dL)	5.68	14.5	11.9	11.3
	50409	Liver Volume (cc)	5.82	1182	1528	1584
	50910	Liver Volume (cc)	6.18	1432	1842	1950
	50910	Spleen Volume (cc)	6.18	614	853	851
	140702	Hemoglobin (g/dL)	8.87	15.1	12.9	11.7
	51005	Hemoglobin (g/dL)	12.09	11.9	10.1	9.9
	110201	Spleen Volume (cc)	12.22	341	459	459
	50504	Liver Volume (cc)	17.54	1783	2284	2292
	80404	Spleen Volume (cc)	18.37	171	229	292
	100101	Liver Volume (cc)	18.99	1273	1582	1592

* Treat.=Treatment; Pat.=Patient; COVLF=Confirmed organ volume and lab failures sensitivity analysis

[1] Q2=Infusions every 2 weeks; Q4=Infusions every 4 weeks

[2] Organ volume and lab values are confirmed using assessment at the following visit.

Note: Patients experiencing a spleen or liver failure at their last assessment are not treated as failures because they do not have an opportunity for a repeat assessment. These patients are thus treated as not having met the endpoint and are censored.

Version: 16:14 / 04AUG2006

CHAPTER 2

PROJECT 2

Innovative therapeutic approaches in mucopolysaccharidosis type 2

SECTION 1

Observational study for the evaluation of efficacy of Iduronate-2-Sulfatase Enzyme Replacement Therapy in patients with mucopolysaccharidosis type 2

SECTION 2

Preliminary results of a substrate reduction therapy in cellular models of mucopolysaccharidoses

BACKGROUND

CLINICAL PHENOTYPE; BIOCHEMICAL AND MOLECULAR BASIS; GENOTYPE / PHENOTYPE CORRELATION

The mucopolysaccharidoses are a group of lysosomal storage diseases caused by deficiencies of 1 of the 10 enzymes required to catabolize glycosaminoglycans (GAGs). As a result, GAGs accumulate in the lysosomes of affected tissues with clinical consequences that can vary in each individual patient. The common pathophysiology is the lysosomal storage of the GAGs molecules leading to cellular engorgement, organomegaly, tissue destruction, and organ system dysfunction. The storage of GAGs is continuous; thus, the clinical syndromes are all chronic and progressive. Invariably, these diseases are associated with disabling morbidity as well as very early mortality. Many of these diseases are associated with death in infancy or early childhood. A variable neurological involvement has been shown in some of these (MPS I-Hurler, MPS II-severe phenotype, MPS III and MPS VII).

MPS II or Hunter syndrome is an X-linked recessive disease caused by the deficiency of the lysosomal enzyme iduronate-2-sulfatase (I2S). I2S functions to cleave O-linked sulphate moieties from both dermatan sulphate and heparan sulphate (fig. 1 and 2); therefore, due to the deficiency of I2S, these molecules progressively accumulate in different tissues in MPS II patients.

MPS II is a rare disease with an estimated incidence ranging between 1/72.000 and 1/132.000 live births. Although theoretically only males are affected, rare MPS II females were also described: in most cases, the X inactivation is not casual, involving the preferential expression of the mutated X chromosome (Clarke JT et al, 1990; Sukegawa K et al, 1997).

The clinical manifestations depend on the GAGs accumulation in the respiratory tract, heart, liver, spleen, leptomeninges, bones, joints, oropharynx, head, neck and central

nervous system. Oropharyngeal and respiratory deposition of GAGs leads to severe airway obstruction because of the presence of macroglossia, supraglottic narrowing, and tracheomalacia. Deposition of GAGs in the heart, liver, and spleen leads to organomegaly (fig 3), and cardiac valves are affected as well. The bone and joint involvement leads to severe skeletal deformities and limitations of joint mobility (fig.4).

There is a wide spectrum of clinical severity among MPS II patients. In the most severe cases, central nervous system involvement leads to mental retardation and progressive neurological decline. The clinical manifestations of MPS II generally lead to death in the first or second decade of life. In the less severe form of MPS II, death may occur in early adulthood, but some patients have survived into the fifth and sixth decades of life.

I2S is a monomeric glycoprotein containing 550 amino acids and 8 potential N-linked glycosylation sites, but different molecular forms have been identified in different tissues, reflecting a different processing of the enzyme.

The human gene of I2S was mapped in chromosome Xq28 and contains 9 exons that extend to 24 kb.

A considerable mutational heterogeneity was found in MPS II patients (319 different mutations have been identified) (Filocamo et al, 2001; Froissart et al, 2002; Froissart et al, 2007, Human Gene Mutation Database). Most affected subjects show missense, nonsense or frameshift mutations, altered splice sites, small insertions or deletions. A genotype-phenotype correlation has been shown for some mutations; it was noticed that patients with a wide deletion or arrangement of the I2S gene (about a fifth of the patients) have the severe form of the disease (Bonucelli G et al, 2001; Vafiadaki E et al, 1998).

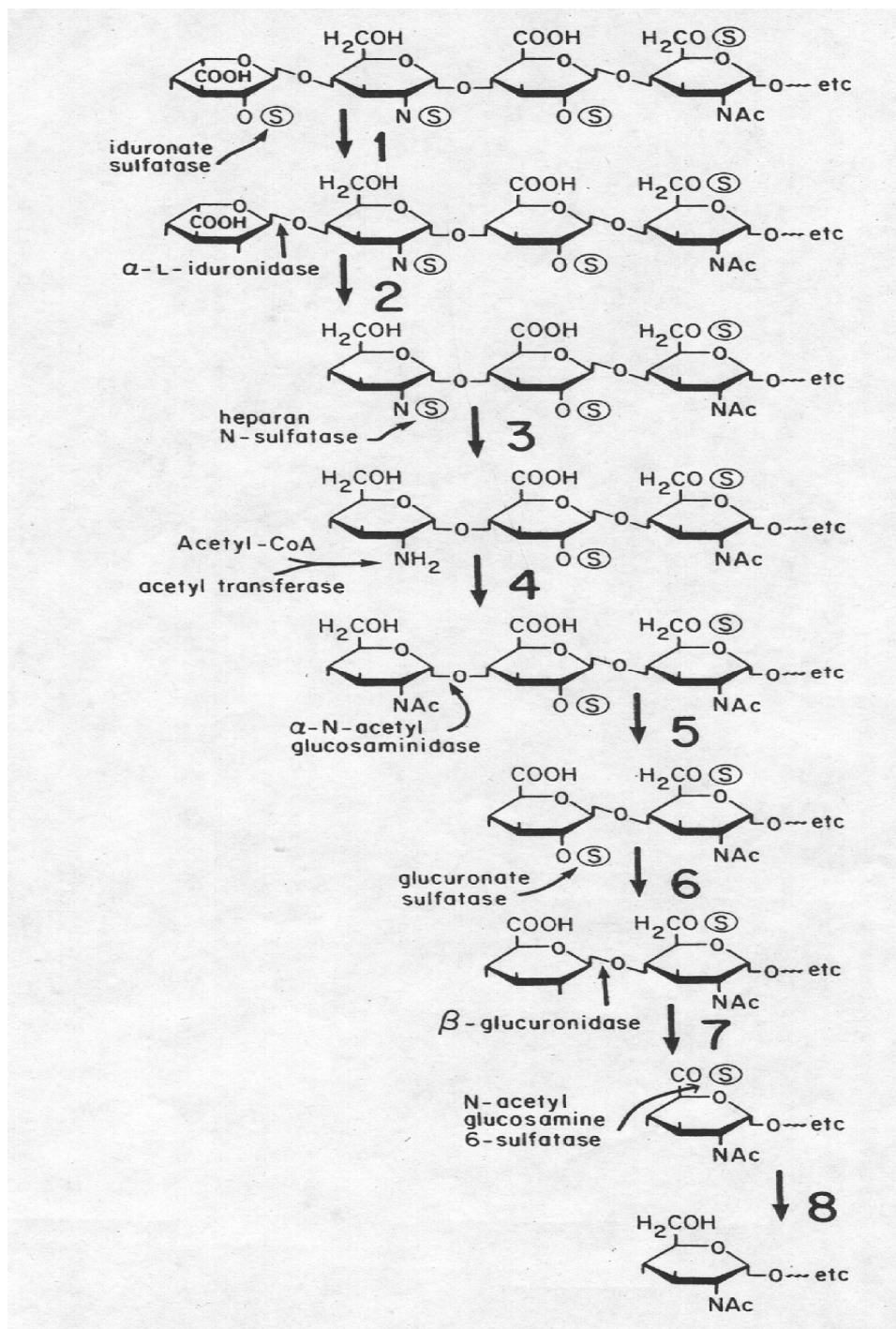


Figure 1. Degradation of heparan sulphate. The iduronate-2-sulfatase removes the 2-*O*-sulfate group on the iduronic acid residue

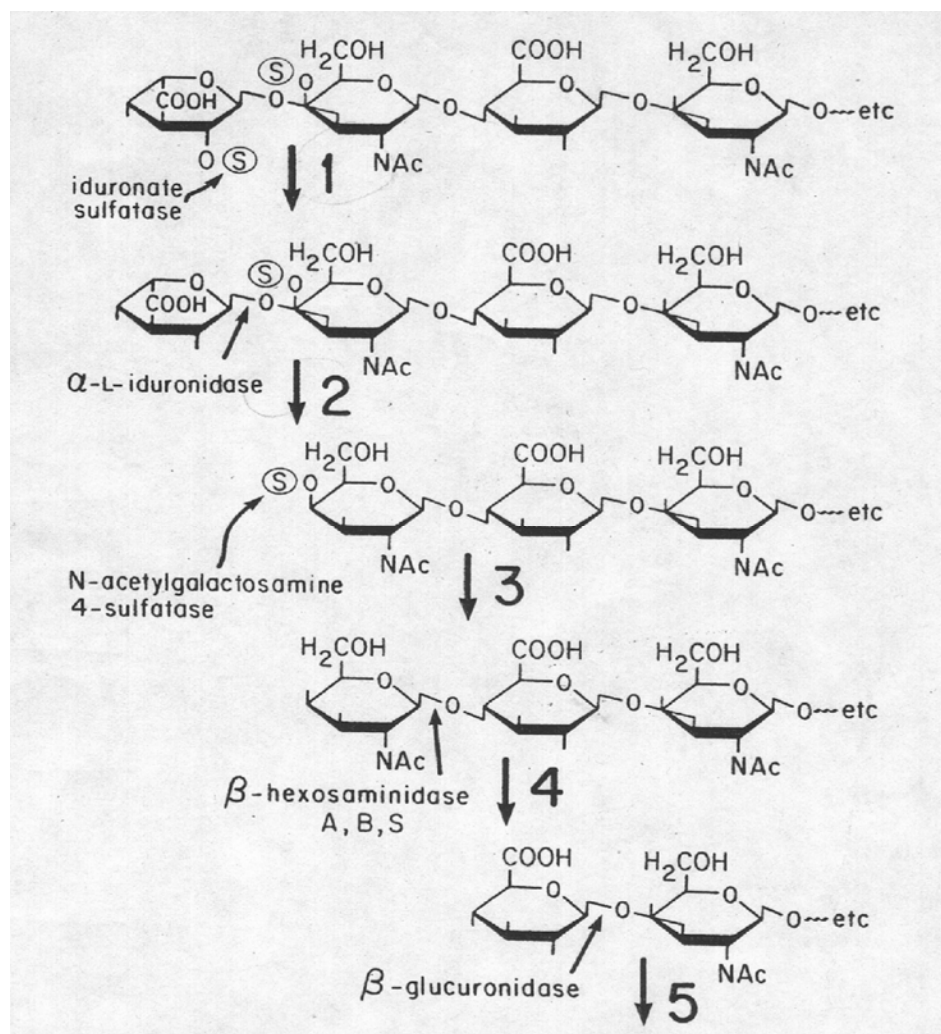


Figure 2. Degradation of dermatan sulphate. The iduronate-2-sulfatase removes the 2-O-sulfate group on the iduronic acid residue.



Figure 3. Visceromegaly and umbelical hernia in a patient with MPS II



Figure 4. Claw hand in a patient with MPS II

THERAPEUTIC APPROACHES

There is no effective therapy for MPS II and attempts at therapy are palliative in nature and focused on the management of the clinical symptoms. Bone marrow transplantation has been utilized in an attempt to deliver functional enzyme activity. While bone marrow transplantation is recommended for patients with MPS I (Hurler, Hurler-Scheie, or Scheie syndrome), a limited experience has been collected in MPS II, with poor results (Bergstrom SK et al, 1994; Coppa GV et al, 1995) so that it is not currently recommended for patients with MPS II (Neufeld et al 2001, Beaudet et al 1999; Hoogerbrugge, et al 1995).

Two innovative therapeutic approaches have been proposed at the moment for the treatment of mucopolysaccharidoses: *enzyme replacement therapy (ERT)* and *substrate reduction therapy (SRT)*.

Only two trials have been reported to date, enrolling MPS II patients presenting with mild to moderate phenotype (Muenzer J et al, 2006; Muenzer J et al, 2006).

They showed the efficacy of the ERT on many clinical features mainly evidencing the reduction of the GAGs urinary excretion, the liver volume and the improvement of the forced vital capacity, the walking distance and the joint motility.

Controversial results about the efficacy on the number of apneas and the cardiac left ventricular mass have been observed in the phase I study on 12 patients treated for 24 weeks. No additional data have been reported in the following double-blinded controlled trial.

No efficacy of ERT on neurological involvement can be expected. Alternative approaches are needed to study to treat the neurological manifestations. While preliminary studies suggest the probable role of the SRT in the treatment of MPS (Roberts et al, 2006; Piotrowska et al, 2006), no clinical experience has been reported to date.

RATIONALE OF THE ENZYME REPLACEMENT THERAPY (ERT) AND OF THE SUBSTRATE REDUCTION THERAPY (SRT).

I2S is a sialylated glycoprotein and contains mannose-6-phosphate (M6P) residues, the latter targeting the protein to its site of action in the lysosome. The peculiar properties of lysosomal enzyme trafficking makes I2S enzyme replacement therapy a feasible therapeutic strategy for patients with MPS II. Enzyme replacement therapy with I2S in patients with MPS II offers the possibility of a safe and efficacious approach for the treatment of this disease.

Transkaryotic Therapies (TKT) and, then, Shire Human Genetic Therapies made a highly purified preparation of recombinant human iduronate-2-sulfatase (idursulfase; rh-IDS; DRX006A) for enzyme replacement therapy, obtained in a human cellular line that produces a glycosylated protein analogous to the native human enzyme. Moreover the idursulfase contains also sialylated residues, that prolongs the half-life of the circulating enzyme.

The substrate reduction therapy (SRT) is based on the principle of slowing down or preventing the accumulation of a substrate caused by the lack of an enzyme, inhibiting its synthesis. Presently the SRT is used for the treatment of Gaucher disease and its use has been proposed for the treatment of other LSDs (Cox et al, 2003). The great advantage of the SRT compared with other therapeutic approaches, such as ERT, is that the small molecules can cross the blood-brain-barrier (BBB), therefore having probable efficacy on neurological symptoms.

Given the broad heterogeneity in both the expression as well as the rate of progression of clinical manifestations in MPS II, and also given its rarity, designing studies in patients with MPS II presents many challenges. This sets a non-traditional approach to clinical trial design and analyses to capture clinical benefit across the evaluation of multiple outcomes in small and clinically heterogeneous study populations. Furthermore only multi-centric

international trials, supported by drug companies, can enrol a wide sample of patients. The other major challenge to therapeutic studies in patients with MPSII is the interpretation of clinical benefit derived from treatment. Due to the progressive and irreversible nature of the disease, any improvement and, in many cases, stabilization of clinically relevant manifestations of the disease should be viewed as clinically significant. Moreover, the demonstration of clinical improvement could also be limited by the short duration of treatment in clinical studies.

Given these considerations even single observations are useful to add information about the efficacy of new therapeutic approaches.

To investigate the efficacy of ERT in MPS II we studied the effects of the treatment in an affected patient, who has been enrolled in the extension phase of the multi-centric international trial (TKT024EXT) at the Department of Pediatrics of Federico II University of Naples and in two further patients that have been followed in an observational study.

To investigate further therapeutic approaches we explored the rationale of the substrate reduction therapy in cellular models of MPS II.

Observational study for the evaluation of efficacy of Idursulfase Enzyme Replacement Therapy in patients with mucopolysaccharidosis type 2

AIM OF THE STUDY

- To evaluate the efficacy of idursulfase Enzyme Replacement Therapy (ERT) in mucopolysaccharidosis type II, adding further clinical experiences through the analysis of data obtained in 3 patients.

PATIENTS AND METHODS

PATIENTS

Three MPS II patients have been followed at the Department of Pediatrics of the Federico II University of Naples, in an observational study to evaluate the results of ERT with idursulfase. Patients have been treated for different periods of time and have heterogeneous phenotype, clinical conditions and age at baseline.

The **case 1 (SA)** has been enrolled in the TKT024 study, the first international trial supported by TKT/Shire to evaluate the safety and efficacy of the ERT in MPS II, receiving treatment every other week for 52 weeks (arm of idursulfase treatment alternating weekly with placebo).

Subsequently he was enrolled in the extension phase of the preceding study (TKT024EXT) at the Department of Pediatrics of Federico II University of Naples as local site, among a sample of 96 patients from the double-blind phase of Study TKT024 and received the rh-IDS treatment once-weekly for two additional year; then he continued the treatment at the same regimen with the commercial drug.

Study TKT024EXT is a single-arm, open-label extension of Study TKT024. All patients received once-weekly active treatment with idursulfase. The duration of this extension study was 2 years, with each year consisting of 52 weekly infusions of idursulfase.

Safety and efficacy outcomes were determined at 6-month intervals, performing the scheduled investigations at the coordinator centre in Manchester.

The primary objective of the TKT024EXT trial was to collect long-term safety and clinical outcome data in patients with MPS II who are receiving idursulfase enzyme replacement therapy. The secondary objective was to collect safety data on idursulfase manufactured at commercial-scale. Pulmonary function, as measured by FVC and Six-Minute Walk Test (6MWT) were chosen as primary clinical outcomes. Safety have been determined by standard clinical and laboratory measurements.

Joint Mobility Assessment (JROM), combined liver and spleen size, urine GAG levels and Cardiac Left Ventricular Mass (LVM) were selected as secondary clinical outcomes.

The whole results about efficacy and safety outcomes of the multi-centric international trial are not available to local sites at the moment.

The results obtained in case 1 have been summarized in the observational study, together with the data obtained in 2 further patients.

The **case 2 (LN)** and the **case 3 (MP)** began the therapy at the Department of Pediatrics as soon as the commercial drug has been available, receiving the treatment weekly for six months.

The diagnosis of MPSII has been suspected on the base of clinical manifestations and of the increased urinary excretion of GAGs and it has been confirmed by the deficiency /absence of iduronate-2-sulfatase enzyme activity measured in cultured skin fibroblasts (based on normal range of measuring laboratory) and by the molecular analysis of the gene. The biochemical and molecular data and the main clinical features of the three patients are summarized in table 1.

Patients	Age (years)	IDS activity (U/mg)	Molecular analysis	Short stature	Skeletal involvement	Heart involvement	Respiratory involvement	Ocular involvement	Hearing involvement	MR	Visceromegaly	Hernias
Patient 1 (SA)	10	0,174	p.W12X	++	++	++	++	+	++	+	+	+
Patient 2 (LN)	9	0,045	c.890G>C	++	++	+	++	-	?	++	++	++
Patient 3 (MP)	16	0	p.E375_G394del	+++	++	+	+	-	+	-	+	+

Table 1. Baseline: age, enzymatic activity, molecular analysis, clinical features in three MPSII patients

METHODS

Therapy

With the exception of the patient 1, who performed the ERT every other week for the first 12 months, in all patients the treatment with rh-IDS has been administered weekly (± 3 days) by a 3-hour continuous IV infusion at a dose of 0.5 mg/kg, diluted in saline solution, with a total volume of 100 ml.

The drug has been administered with a standard procedure, increasing the rate of infusion as synthesized in table. 2.

Time (min)	0-15	15-30	30-45	45-60	60-180
Rate of infusion (ml/h)	8	16	24	32	40

Table 2: Rate of infusion of rh-IDS

During infusion vital parameters as heart and respiratory rates, blood pressure, oxygen saturation and body temperature have been registered every 30 minutes.

A pre-medication with anti histaminic drugs, corticosteroids and decrease of infusion rate has been administered in case of allergic reactions.

Clinical and instrumental evaluation: flow-chart

Patient 1: SA periodically performed the scheduled evaluations at the coordinator centre of the international trial in Manchester, according to the following scheme:

	MONTHS OF TREATMENT								
	T ₀	T ₃	T ₆	T ₉	T ₁₂	T ₁₈	T ₂₄	T ₃₀	T ₃₆
Urinary GAG excretion	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ECG; echocardiography	X		X		X	X	X	X	X
Spirometry	X		X		X	X	X	X	X
Abdominal MRI	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6-Minute Walking Test (6MWT)	X		X		X	X	X	X	X
Joint range of motion (JROM)	X		X		X	X	X	X	X
Skeletal X-ray	X				X		X		X

Additional investigations have been performed at the Department of Pediatrics, including sleep studies and psychometric evaluations.

	MONTHS OF TREATMENT						
	T ₀	T ₆	T ₁₂	T ₁₈	T ₂₄	T ₃₀	T ₃₆
Polysomnography	X				X		X
Psychometric tests	X		X				X

Patient 2 and 3: LN e MP performed scheduled evaluations at the Department of Pediatrics at baseline and after six months of treatment as follow:

	MONTHS OF TREATMENT	
	T ₀	T ₆
Urinary GAG excretion	X	X
ECG; echocardiography	X	X
Abdominal MRI/ultrasound	X	X
6MWT	X	X
JROM	X	X
Skeletal X-ray	X	
Polysomnography	X	X
Psychometric tests	X	X

RESULTS

Our data provide additional information about the treatment of MPSII patients by ERT. Nevertheless they should be considered as partial, mainly due to the short follow-up in two patients and the difficulty to perform the scheduled investigations in each patient given their poor collaboration.

Urinary GAGs excretion

A reduction of the urinary GAGs excretion has been observed in all patients. In SA a progressive decrease has been showed, which was sustained up to 36 months of treatment (T1=135 mg GAG/g creatinine; T36=279). In LN and in MP the urinary GAGs concentration after six months was in the normal range, showing respectively 70% (T0=291,5; T6=86 mg GAGs/g creatinine) and 75% (T0=411; T6=104 mg GAGs/g creatinine) of reduction in comparison to the baseline (Fig.6).

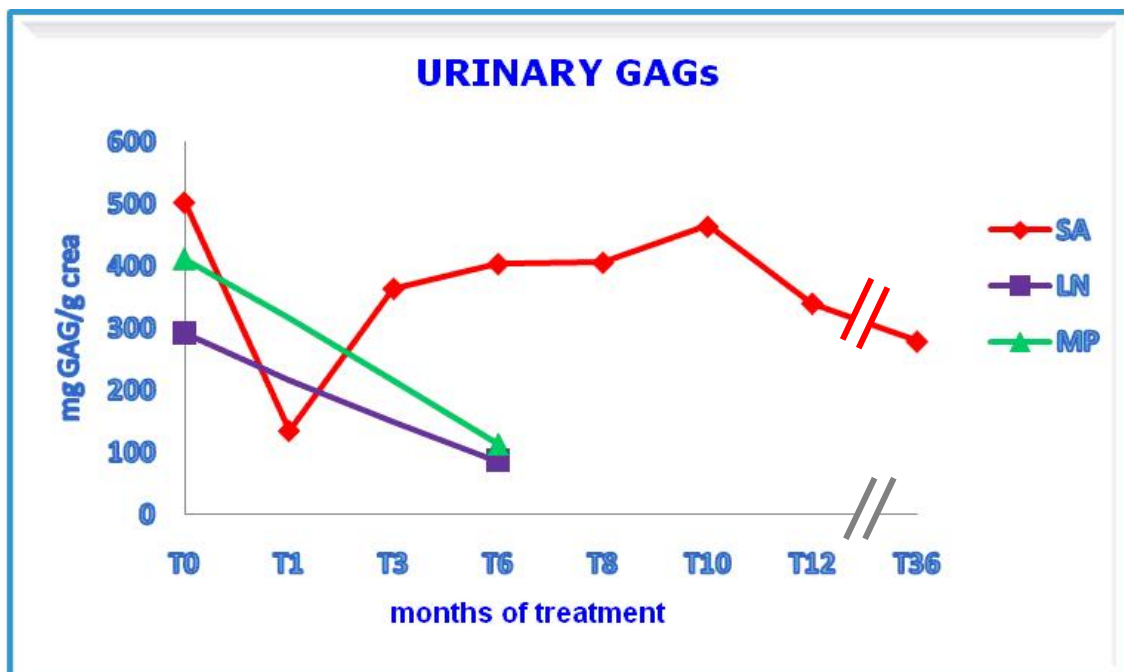


Figure 6. Urinary GAGs excretion (mgGAG/g creatinine), at baseline and after treatment.

Respiratory involvement

Two main parameters have been investigated, as the forced vital capacity (FVC) by standard spirometry techniques, similarly to the multi-centric trial (where the variations of the FVC represented a primary endpoint) and the apnea-hypopnea index with the aim of exploring the efficacy of ERT on the upper airways obstruction.

Concerning the FVC controversial results have been obtained.

SA didn't show any improvement of the FVC (T0 = 51% of predicted values; T36 = 37%). Nevertheless the last evaluation could be invalidated because of a concomitant respiratory infection. Unfortunately the results of the intermediate evaluations have not been made available by the sponsor to the local centres participants to the trial.

In MP an increase of the FVC has been observed, with results apparently in the normal range (T0 = 107%; T36 = 122%) (Fig. 7). These data have to be carefully evaluated, since the predicted normal values of the FVC are calculated on the base of weight, height and age of the patient. So in MP the presence of a severe short stature could determine overestimated values.

LN was not able to perform the spirometry due to the severe mental retardation.

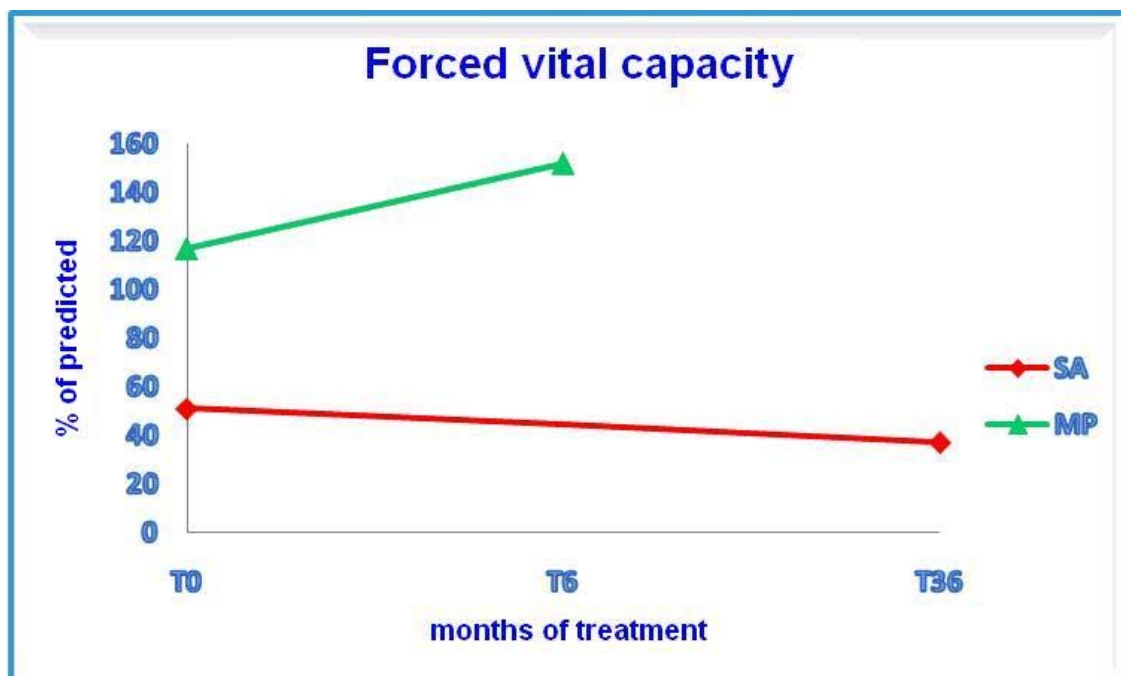


Figure 7. Forced vital capacity, as % of predicted values, in SA and MP at baseline and after treatment

A remarkable improvement of the apnea-ipopnea index has been shown both in SA (T0=15,4 to T36=4,1) both in LN (T0=43,7; T6=19).

These results seem to have crucial importance, suggesting that ERT could have some efficacy on the upper airways obstruction. On the contrary in MP our data showed the absence of upper airways obstruction at the baseline (T0 = 2) and a severe involvement after six months of therapy (T6 = 30,8) (Fig. 8). Since the last datum could have been vitiated by a concomitant respiratory infection it need to be evaluated again at the next scheduled follow-up.

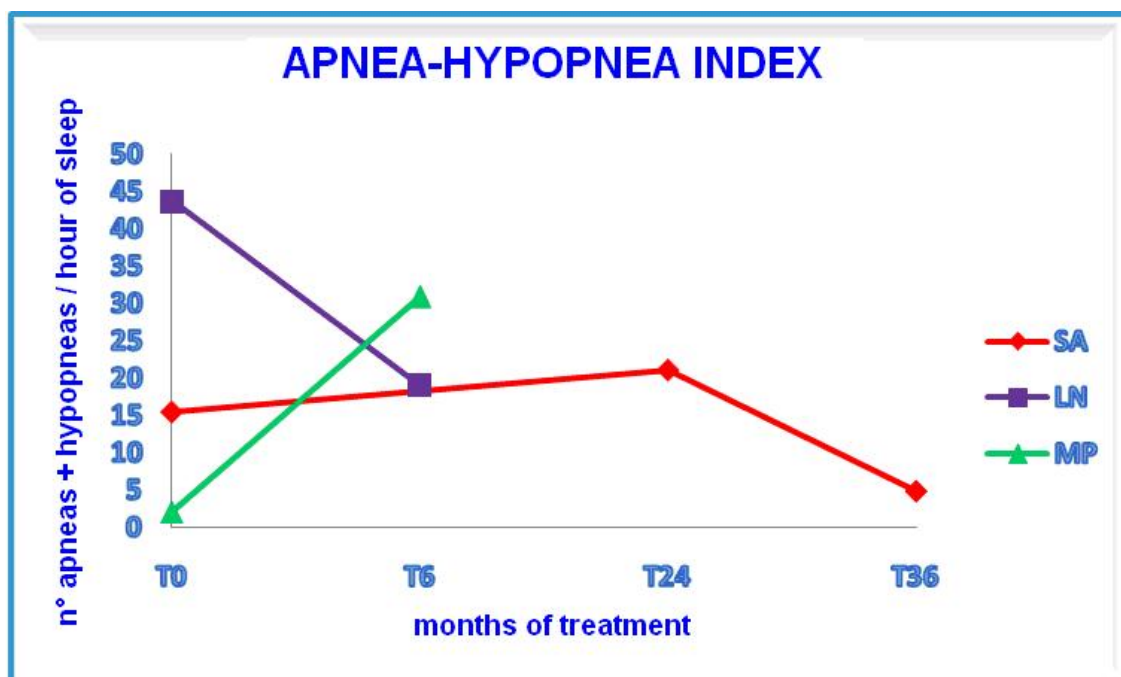


Figure 8. Apnea-hypopnea index in three MPS II patients at baseline and after treatment.

Visceromegaly

An abdominal MRI has been performed in two collaborating patients (SA and MP). A progressive reduction of the liver volume, reaching a normal value after 36 months of treatment (Fig. 9) and stabilization of the spleen volume have been observed in SA (Fig. 10). Stabilization of liver and spleen size has been measured in MP (Fig. 9, Fig. 10).

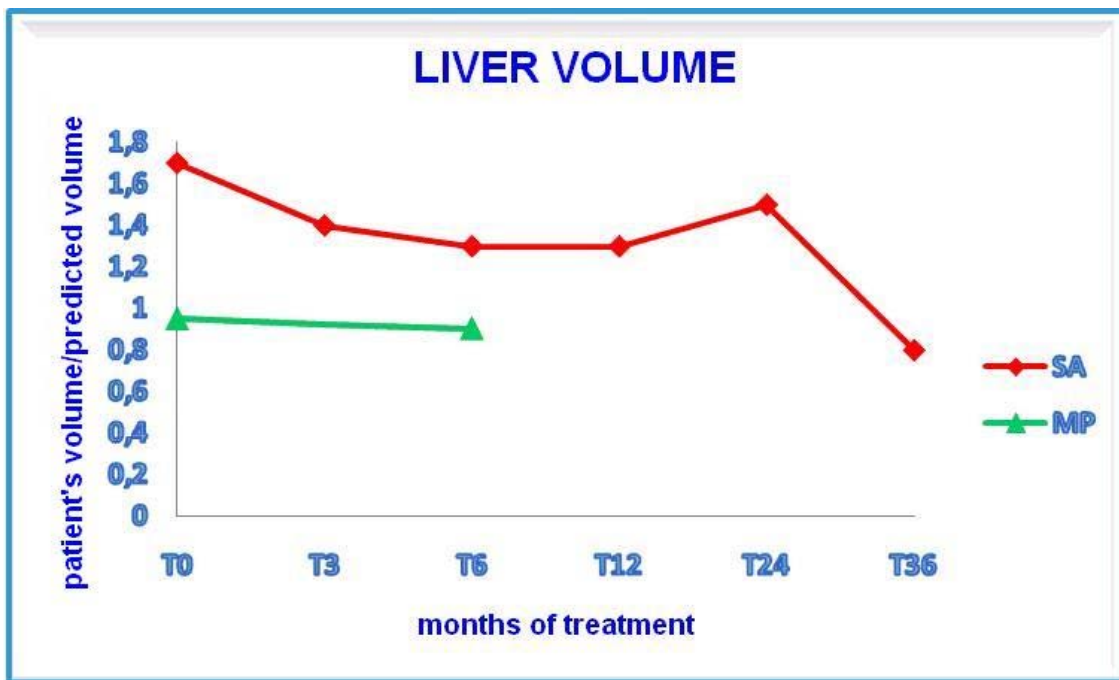


Figure 9. Relative change of the liver volume in comparison to the predicted normal value, calculated on the base of the patient's weight.

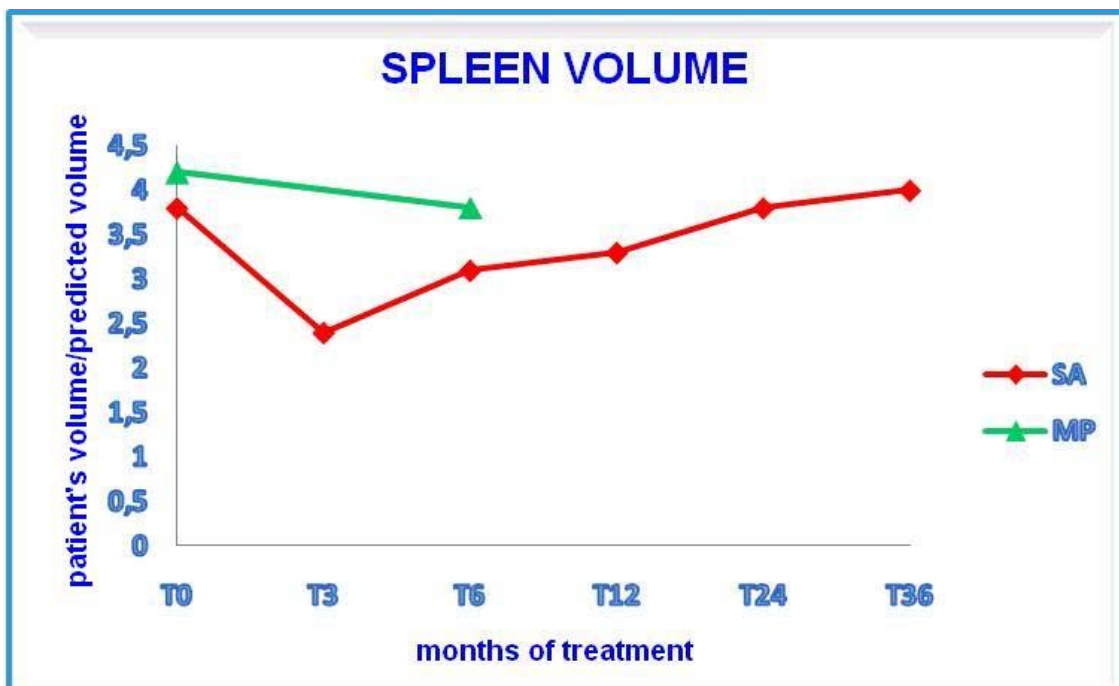


Figure 10. Relative change of the spleen volume in comparison to the predicted normal value calculated on the base of the patient's weight.

Due to the poor collaboration the liver and spleen size have been detected in LN by ultrasound measurement of the longitudinal diameter of the liver right lobe and the longitudinal diameter of the spleen. Stabilization of the liver and spleen size have been observed. Both resulted slightly above the normal range (Fig. 11).

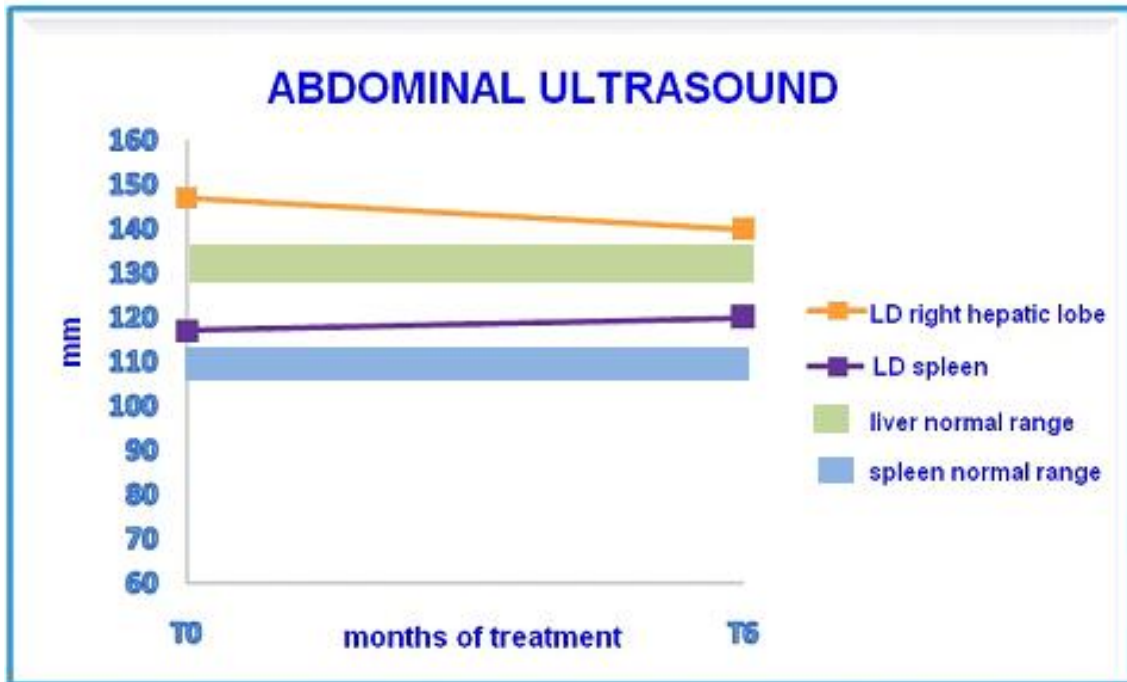


Figure 11. Longitudinal diameter of the liver right lobe and spleen at T₀ and T₆ in LN

Endurance and joint involvement

- ***6 Minutes Walk Test (6MWT)***

The 6-minutes walk test (6MWT) has been used to evaluate the functional status of a subject, exploring the resistance to a physical effort and the joint mobility. This test has been used in the international clinical trial as a primary efficacy endpoint. Normal ranges depends on height and stride length and there are no normative data for children. Independent community ambulation, defined as the ability to walk at near normal speed of 80 m/min for 332 m is considered to be functionally important for activities such as crossing a street or performing an errand in the neighbourhood and therefore it is suggested that a 6MWT distance of less than 300 metres should be considered an indication to treatment in MPS patients.

In SA a progressive increase of the walking distance has been observed during treatment. (T0 = 394 m; T24 = 432 m; T36s = 482 m).

In LN a relevant improvement of the impaired endurance at baseline has been shown (T0= 252 m; T6= 384 m).

In MP a steady walking distance has been evidenced (T0 = 446 m; T6 = 458 m) (Fig. 12).

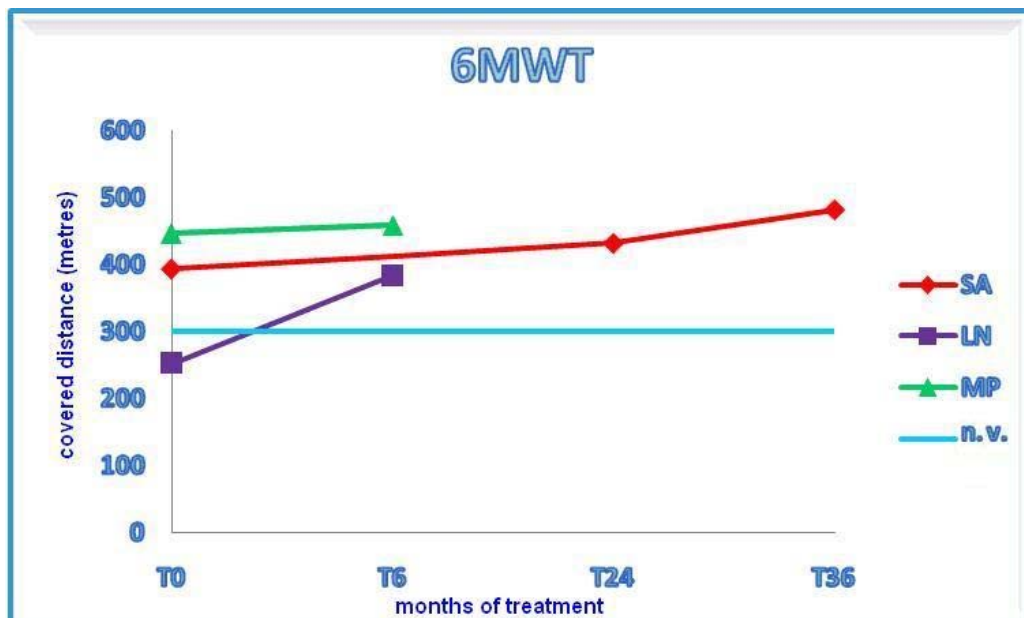


Figure 12. Walking distance in meters obtained by 6 Minute Walk Test in three MPS II patients at baseline and after treatment.

- *Joint mobility*

Joint mobility has been explored measuring the excursion at different joints. As in the multi-centric trial a variation of the joint excursion higher than at least 10°, has been considered significant.

A remarkable improvement of the joint motility has been appreciated in each patient, particularly at some proximal joints as the shoulder, showing an increase of the flexion, extension and/or abduction (together or singly). A moderate increase in the elbow but a worsening of the wrist and knee mobility has been appreciated (only in SA an increase of the wrist range of motion has been observed) (tab. 3). Different joints (hip and ankle) did not evidence any significant changes (data not shown).

	SA	LN	MP
Shoulder (right)			
Flexion	+ 21	0	+ 40
Extension	+ 14	+ 10	+ 10
Abduction	- 16	0	+ 10
Shoulder (left)			
Flexion	+ 10	0	+ 40
Extension	+ 6	+ 10	0
Abduction	- 12	0	+ 20
Elbow (right)			
Flexion	+ 11	+ 10	+ 10
Extension	- 4	- 5	+ 10
Elbow (left)			
Flexion	+ 12	+ 5	+ 10
Extension	- 13	+ 5	0
Wrist (right)			
Flexion	+ 15	0	- 40
Extension	- 7	- 5	+ 10
Wrist (left)			
Flexion	+ 7	- 10	- 40
Extension	+ 21	0	- 10
Knee (right)			
Flexion	- 14	- 10	+ 20
Extension	- 6	+ 35	- 5
Knee (left)			
Flexion	- 21	- 10	+ 10
Extension	+ 3	+ 35	- 40

+ increase of joint excursion in comparison to baseline

- decrease of joint excursion in comparison to baseline

Table 3: Change of joint excursion (in grades) of shoulder, elbow, wrist and knee from baseline to the last observation in SA (after 36 months) and in LN and MP (after 6 months)

Heart involvement

As in the pivotal trial the cardiac left ventricular mass (LVM) has been measured every six months; the ejection fraction (EF) has been further investigated in our study as a parameter to evaluate the cardiac function.

In SA, after a temporary increase of LVM during the first six months of treatment (when rh-IDS was administered every two weeks), an evident reduction has been observed. Despite the reduction of the LVM, any functional improvement (as shown by the EF assessment) has been detected; a concomitant worsening of the valvular pathology (from mild to moderate mitralic insufficiency) was assessed. Instead in LN and in MP both the LVM, both the EF seemed steady (Fig. 13, Fig. 14).

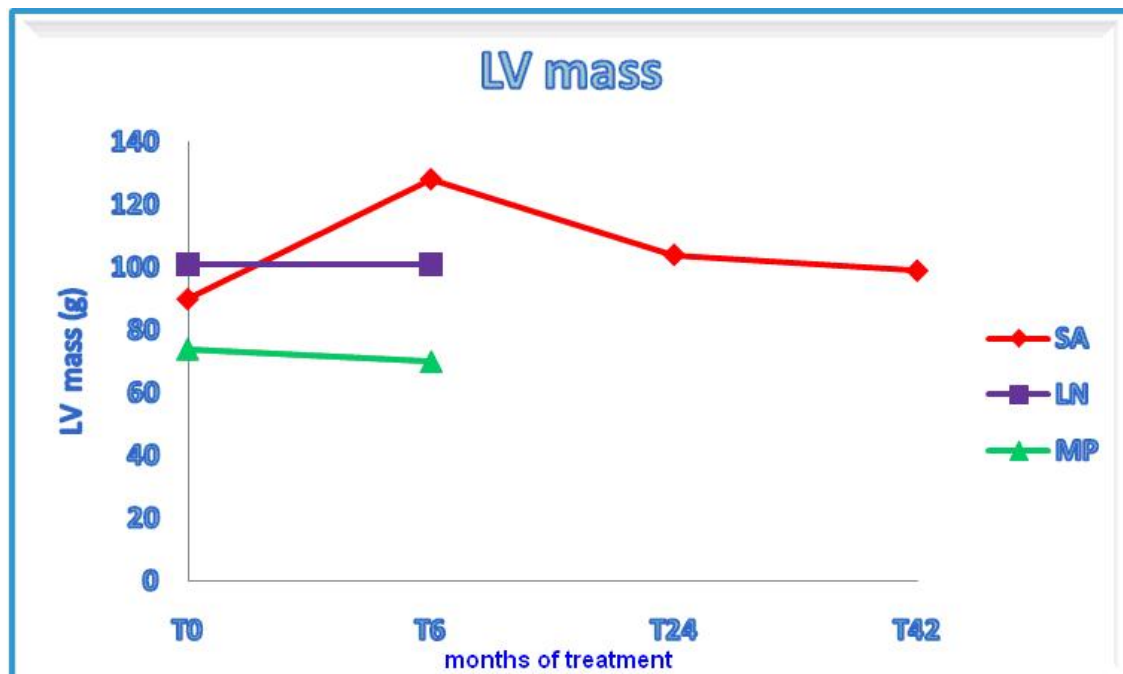


Figure 13. Change of LVM in three patients at baseline and after treatment

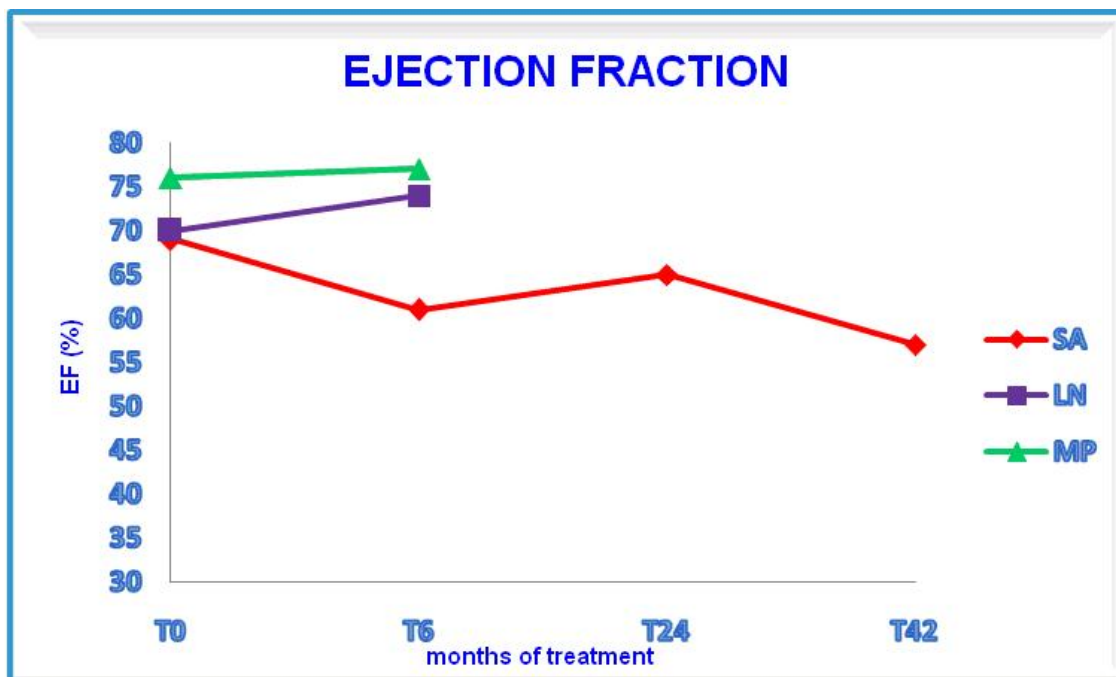


Figure 14. Change of EF in three patients at baseline and after treatment

Neurological involvement

Our patients showed a different neurological involvement at baseline representing different phenotypes of the continuous spectrum of severity. As expected, the ERT did not have any effect on the psychomotor regression in patients who manifested neurological involvement.

As a matter of fact, both in SA and in LN a progressive decrease of the intellectual quotient assessed by the Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence (WPPSI) has been observed.

The intellectual quotient in MP, assessed by the Wechsler Intelligence Scale for Children (WISC-R) appeared steady in the time, due to the absence of a severe neurological involvement (Fig. 15)

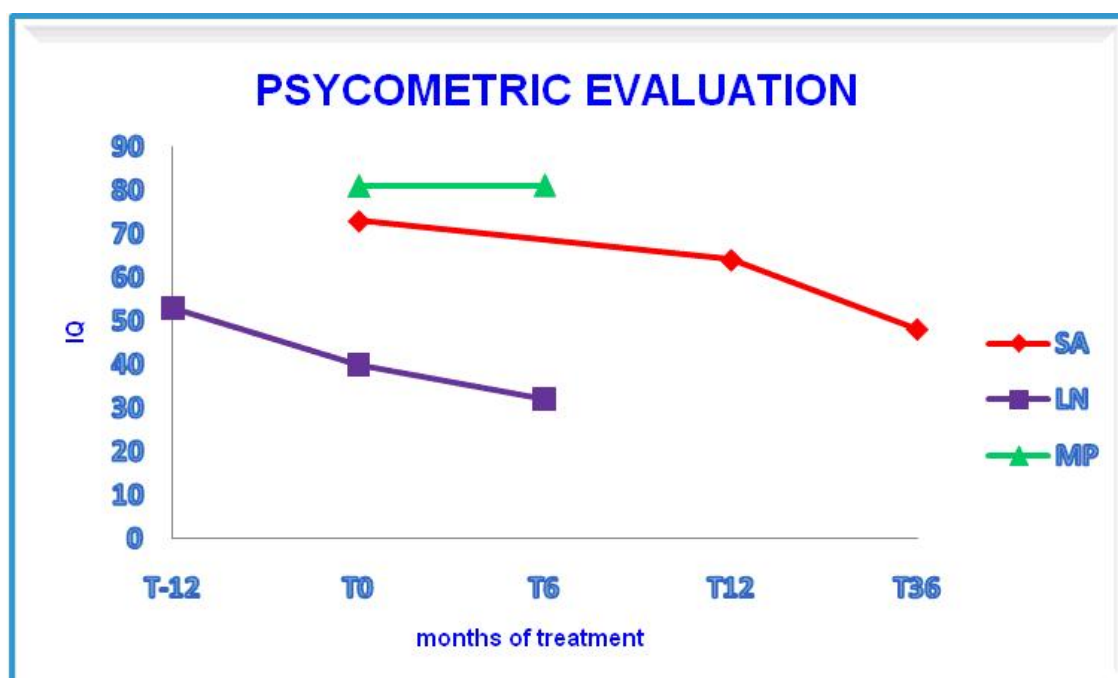


Figure 15. Change of intellectual quotient in three patients, assessed by the Wechsler Intelligence Scale (WPPSI and WISC-R).

SECTION 2

C) *Preliminary results of a substrate reduction therapy in cellular models of mucopolysaccharidoses*

AIM OF THE STUDY

- To investigate alternative therapeutic approaches based on the substrate reduction therapy (SRT) in cellular models of ERT.

Considering the limits of ERT, particularly in patients showing neurological involvement, a preliminary evaluation of different therapeutic approaches based on the substrate reduction therapy has been performed.

The effects of inhibitors of the GAGs synthesis in cultured skin fibroblasts from patients with MPS II have been explored at the Department of Pediatrics of Federico II University of Naples, in collaboration with the Telethon Insitute of Genetics and Medicine (TIGEM).

METHODS

Skin fibroblasts from a MPS II patient and from a control have been cultured in T25 flasks in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum) and antibiotics.

At confluence, the cells were incubated with the following non-specific inhibitors of the glycosaminoglycans synthesis: rhodamine B (Sigma-Aldrich) and genistein (Sigma-Aldrich).

Different concentrations of rhodamine B (10 and 50 µg/ml) were added to the medium for 24 and 48 hours, and of genistein (40 and 120 µl/ml) for 96 hours. Cells incubated with rhodamine B showed signs of toxicity after incubation times longer than 48 hours. Following the incubation, cells were washed twice with PBS, trypsinized, centrifuged, and re-suspended in 100 µl of ice-cold distilled water. On these cells the protein concentration was determined using the BIO-RAD protein assay.

The GAGs content was assessed in cell homogenates containing 20 µg of proteins by a quantitative method using, as reagents, a solution with 10.7 mg of DMB (1,9-dimethylmethilene blue) in a buffer of formic acid 55 mM, pH 3.3 and of Tris 2 M.

Stock solutions of dermatan sulphate (2 mg/ml) were progressively diluted to obtain a reference curve from 40 to 2.5 g/ml.

50 µl of samples and standard were incubated in a 96 multiwell plate with 275 µl of a mixture of the solution of DMB and of Tris (ratio 10:1) and the absorbance was read at a 520 nm wavelength. The data were analyzed using the SOFTmaxPro software.

RESULTS

Reduction of the GAGs concentration by inhibiting their synthesis

With both compounds, rhodamine B and genistein, a reduction of the GAGs concentration has been observed in the incubated MPSII cells in comparison to the controls.

Rhodamine B

After incubation with rhodamine B the GAGs concentration decreased, particularly after a 48 hours at the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 16).

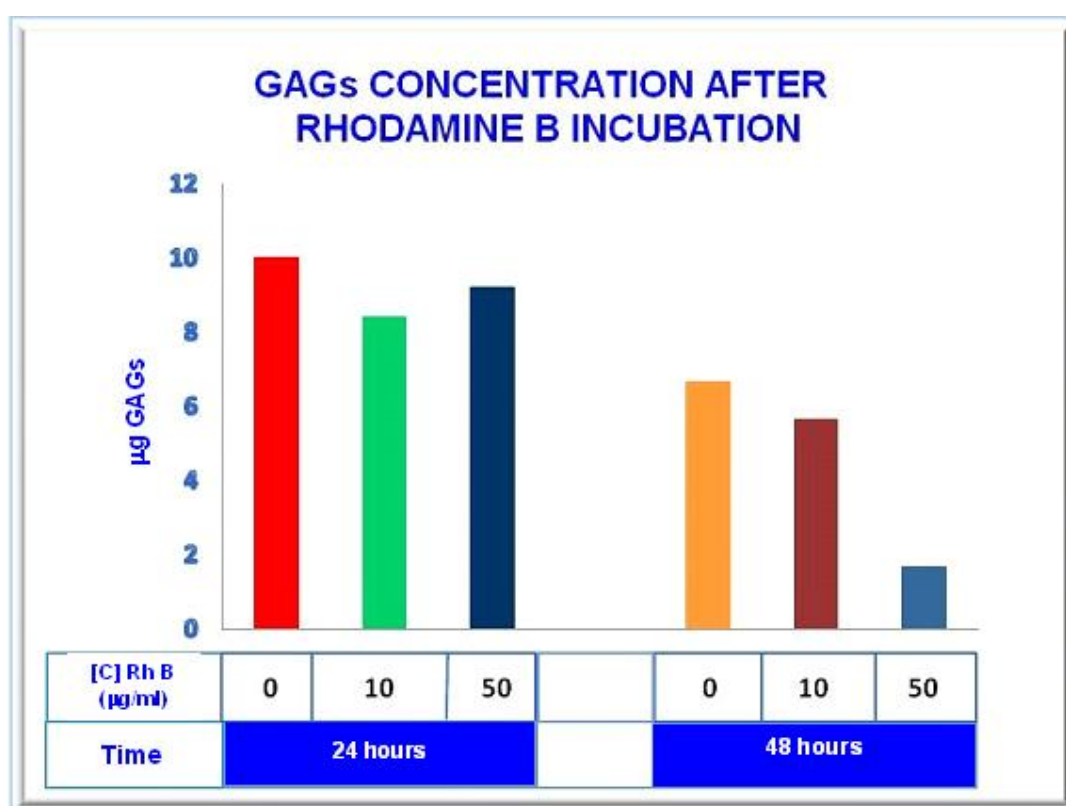


Figure 16. GAGs concentration in cultured skin fibroblasts from a MPS II patient, after 24 and 48 hours incubation with different concentrations of rhodamine B.

Genistein

A dose-dependent decrease of GAGs concentration has been shown also after incubation with genistein (fig. 17).

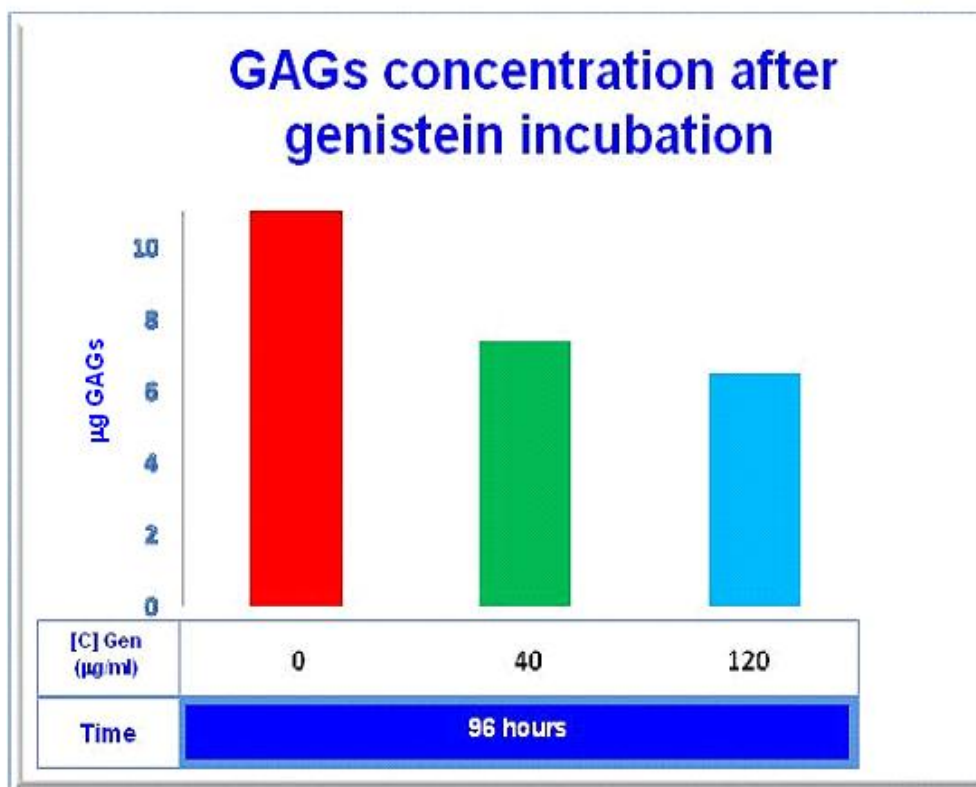


Figure 17. GAGs concentration in cultured skin fibroblasts from a MPS II patient, after 96 hours incubation with different concentrations of genistein.

DISCUSSION

Until the introduction of ERT only supportive care was available for MPS II patients. ERT with Idursulfase represents the first treatment for MPS II aimed at correcting the metabolic defect underlying the disease. A phase I study and a phase II/III controlled trial showed the efficacy of the ERT on several clinical features.

The first study (Muenzer J et al, 2007) enrolled twelve patients affected by MPS II treated with idursulfase ERT for 24 weeks. Encouraging preliminary results were reported, showing the improvements in the 6-MWT and joint range of motion beside the reduction of GAGs urinary excretion and liver volume. The effects on upper airway obstruction and apnea and on cardiac left ventricular mass were variable.

The following study (TKT024) (Muenzer J et al, 2006) was performed on a larger number of MPS II patients and was again aimed at evaluating the efficacy and the safety of the ERT. This study was a double-blind multi-centric trial. Ninety-six patients were randomized to one of three groups with each patient receiving a total of 52 infusions of either idursulfase, idursulfase every other week alternating with placebo, or placebo alone. Patients with severe mental retardation and not cooperating to spirometry were excluded by the trial.

As the primary efficacy endpoint of this study a so-called 2-component composite score was chosen including forced vital capacity (FVC) and distance walked in 6 min (Muenzer et al. 2006). A statistically significant ($P = 0.0049$) improvement in the composite primary efficacy endpoint was seen in patients who received rh-IDS compared to placebo. The decrease in liver and spleen volume, as determined by MRI, the reduction of urine GAG and improvement of joint range of motion observed in the group of patients who received the drug further confirmed the efficacy of idursulfase.

Despite this limited experience to few patients with mild to moderate phenotype, recombinant idursulfase was commercialized with the general indication of treatment of Hunter disease, particularly due to the lack of effective therapeutic alternatives. This allowed a wide access to treatment, with a large number of patients presently being treated with ERT all over the world.

However, published results on idursulfase efficacy are still limited to the first two trials (phase I and II/III). Issues such as the effects of the drug on specific tissues and organs (bone, heart, CNS) still need to be addressed and it is urgent to evaluate the efficacy of

ERT on a wider sample of patients, including different phenotypes and examining the long term effects of treatment in different subgroups.

Due the rarity of the disease, the recruitment of a wide number of patients seems difficult, particularly in a single centre. Therefore, only multicenter efforts may allow studies on a sufficient number of patients and provide significant knowledge. In this respect our study adds further information exploring the efficacy in patients with different phenotypes. Particularly, we focused on the effects on specific clinical parameters that were not thoroughly evaluated in the international clinical trials, as cardiac and upper airways involvement.

In our patients, in agreement with literature, a decreased concentrations of urinary GAGs was observed after treatment with urinary excretion approaching levels close to normal range in two patients. A reduction of liver and spleen size has been shown particularly in SA, who was treated with ERT for a longer period of time.

An improved performance at the the 6MWT was evidenced in all patients; this result seems particularly significant since the increase of the walking distance represents a general improvement of the functional status of the patients and a general reduction of the physical handicap that contributes to impair their quality of life.

Some of the aspects that we have investigated are not consistent with the results of the TKT024 trial. For example, in that study a significant increase was registered only for the elbow excursion, whereas we observed an improvement of the joint range of motion at several joints, with the best results in the excursion of the shoulder.

In addition, in contrast with the reported results that show an evident improvement of the forced vital capacity in most cases, the effect on respiratory involvement in our patients appeared variable.

Due to the morbidity caused by upper airways obstruction in MPS patients and the severe impact of this complication on their quality of life, we performed polysomnography, that may be more appropriate than spirometry to appreciate changes of respiratory involvement after the start of ERT. Two patients with a high apnea-hypopnea index at start of treatment showed a decrease in events per hour, whereas an other one showed a worsening. No data about the efficacy on the upper airways obstruction in the 96 patients enrolled in the TKT024 trial are available.

Finally, in agreement with the reported results, a decrease of the left ventricular mass was seen in all patients, but it was not accompanied by an improvement of cardiac function, possibly due to the worsening of valvular insufficiency.

Overall our results (despite the brief monitoring time and the limited number of patients) provide valuable information on ERT in MPSII.

In agreement with the results of the international trial our results seem encouraging, but they emphasize that the effects of ERT are variable in different tissues. Particular attention should be paid to manifestations that have a real impact on the patient's quality of life.

The documented efficacy of ERT on the reduction of the urinary levels of GAGs is an indication of improved enzymatic activity, but has little implications for the patient's morbidity, mortality and quality of life.

Several tissues and systems seem to respond poorly to ERT. Despite the general performance of patients seems to improve, a clear efficacy on joint stiffness has not been demonstrated. This is also consistent with the larger experiences accumulated in the treatment of the MPS type I, which showed a limited efficacy of the ERT on the bone, despite the success on various clinical and biochemical parameters.

In addition, since the ERT cannot cross the BBB, symptoms due to central nervous system involvement (the most debilitating manifestation in this group of diseases) cannot be treated or prevented and, therefore, this approach is ineffective in patients with severe phenotypes. Nevertheless, the choice to exclude from the treatment patients with CNS involvement may raise ethical problems and at present idursulfase ERT is available to all patients with Hunter, including those with severe phenotypes who are not expected to have any improvement of their health status and quality of life.

Significant discomfort (with an impact on quality of life) derives from the weekly hospitalization to perform intra venous infusions and from the procedures to obtain a suitable peripheral venous access). This problem however becomes less important due to the high expectation towards this treatment, and it is often hard to make patients or their families understand the actual limits of the ERT.

Moreover, considering the high costs of therapy (about 300,000 euro/year per patient) it is crucial evaluating the benefits of the ERT in subgroups of patients in relationship to the very high costs.

Therefore it seems evident the need of national and international recommendations to define access and exit criteria for treatment, as well as to establish the minimal skeduled assessment for monitoring the efficacy and the safety.

Furthermore, it will be crucial to evaluate the real efficacy of ERT with respect to age at start of treatment, speculating that an early therapeutic intervention might lead to a better outcome. In this respect newborn screening programmes for selected lysosomal

storage disorders should be mandatory to identify and treat the disorders before irreversible damage occurs. Moreover the newborn screening for LSD (using the method described by Meikle on dried blood spots) (Meikle et al, 2006) has high sensibility and specificity and low cost.

As it is evident from all the previous observations, different aspects of ERT in MPS II have still to be clarified in order to define the subgroups of patients that can obtain real benefit from the therapy; on the other hand, considering the actual limits of such approach, further therapeutic alternatives have to be developed.

The possibility of using different therapeutic approaches in combination with ERT should also be taken into consideration. Considering the clinical and physiopathological complexity in the MPS II (and in all the LSDs) it might be hypothesized that different approaches could act in a synergistic way on different aspects of the disease, modifying, or, at least, slowing down, its natural course.

In this respect the substrate reduction therapy (SRT) represents one of the most interesting perspectives, particularly considering its supposed efficacy on the neurological involvement. This therapeutic approach is already used in Gaucher patients that are unsuitable for ERT, and its efficacy has been shown on the hematological and visceral manifestations of the disease. The rationale of this approach has been hypothesized also in Niemann-Pick disease type C, and trials are currently in progress, also in our Department, for the evaluation of the efficacy and safety.

There is no previous clinical experience on SRT in MPS, despite preliminary studies in cellular and animal models have shown the proof of principle of such approach in different MPS. In this respect we confirmed the inhibition of the GAGs synthesis by rhodamine B and genistein in MPS II cellular models.

Rhodamine B is a not specific inhibitor of the GAGs synthesis. Its efficacy has been shown both in animal models of MPS IIIA (Roberts et al. 2006; Roberts et al. 2007), and in human fibroblasts from MPS IIIA and MPS VI patients (Kaji et al, 1991). There are no previous experiences that show the efficacy in MPS II. Our results are, therefore, the first to show the potential use of rhodamine B in the treatment of MPS II.

Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) is an isoflavone derived by the soy. Presently its anticarcinogenic properties and its usefulness in cardiovascular diseases and in women menopause have been studied. It is known that genistein is also able to inhibit the synthesis of the GAGs in fibroblasts from patients with MPS I, MPS II, MPS IIIA and MPS IIIB. Our data are in agreement with those of the literature.

Our laboratory results, albeit preliminary, are encouraging and provide in vitro the rationale for a possible clinical application of a SRT based therapy in MPS II, setting the bases for future clinical trials.

In conclusion the results of our observational study confirm some of positive effects of the ERT in MPS II. At the same time they suggest caution, demonstrating that ERT does not have any effect on other clinical features. Furthermore they emphasize the limits of the present experience and the need of additional and more prolonged evaluations. Finally, they emphasize the importance of exploring therapeutic alternatives, such as SRT.

REFERENCES

Bergstrom SK, Quinn JJ, Greenstein R, Ascensao J. *Long-term follow-up of a patient transplanted for Hunter's disease type IIB: a case report and literature review.* Bone Marrow Transplant. 1994; 14: 653-658

Bonucelli G, Di Natale P, Corsolini F, Villani G, Regis S, Filocamo M. *The effect of four mutation on the expression of iduronate-2-sulfatase in mucopolysaccharidosis type II.* Biochimica et Biophysica acta 1537, 2001; 233-238

Clarke JT, Willard HF, Teshima I, Chang PL, Skomorowski MA. *Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) in a karyotypically normal girl.* Clin Genet 1990; 37: 355

Coppa GV, Gabrielli O, Zampini L, et al. *Bone marrow transplantation in Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II): two year follow-up of the first Italian patient and review of the literature.* Pediatr Med Chir. 1995; 17: 227-235

Cox TM, Aerts JMFG, Andria G, Beck M, Bembi B, Chertkoff R, Elstein D, Erikson A, Giralt M, Heitner R, Holalk C, hrebiceck M, Lewis S, Pastores G, Rolfs A, Sa Mranda MC, Zimran A. *The role of iminosugar N-butyldeoxynojirimycin (miglustat) in the management of type I (non-neuronopathic) Gaucher's disease: a position statement.* J Inherit Metab Dis 2003; 26: 513-526

Filocamo M, Bonuccelli G, Corsolini F, Mazzotti R, Cusano R, Gatti R. *Molecular analysis of 40 Italian patients with mucopolysaccharidosis type II: New mutations in the iduronate-2-sulfatase (IDS) gene.* Hum Mutat. 2001;18(2):164-5

Froissart R, Moreira da Silva I, Guffon N, Bozon D, Maire I. *Mucopolysaccharidosis type II – genotype/phenotype aspects.* Acta Paediatr Suppl. 2002; 439: 82-87,

Froissart R, Moreira da Silva I, Maire I. *Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum.* Acta Paediatr 96, 2007; 71-77

Hoogerbrugge, P.M., et al. Allogeneic bone marrow transplantation for lysosomal storage diseases. *Lancet* 1995; **345**:1398-1402.

Human Gene Mutation Database (HGMD), Cardiff, UK www.hgmd.cf.ac.uk

Kaji T, Kawashima T, Sakamoto M. *Rhodamine B Inhibition of Glycosaminoglycan Cultured Production by Cultured Human Lip Fibroblasts*. Tox and Appl Pharma 1991; 111: 82-89

Meikle PJ, Grasby DJ, Dean CJ, Lang DL, Bockmann M, Whittle AM, Hopwood JJ et al. *Newborn screening for lysosomal storage disorders*. Mol Gen and Met 2006; 88: 307-314

Muenzer J, Lamsa JC, Garcia A, Dacosta J, Garcia J, Treco DA. *Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a preliminary report*. Acta Paediatr Suppl 2002; 439: 98-99

Muenzer J, Wraith J E, Beck M, Giugliani R, et al. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). Gen Med 2006; 8:465-473

Muenzer J, Gucsavas-Calikoglu M, McCandless SE, Schuetz TJ, Kimura A. *A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome)*. Mol Genet Metab. 2007;90(3):329-37.

Neufeld EF, Muenzer J. *The Mucopolisaccharidoses*. In: Scriver CR, Beadeut AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, et al, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2001. p.3421

Piotrowska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Barańska S, Tylki-Szymańska A, Czartoryska B, Wegrzyn A, Wegrzyn G. *Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses*. Eur J Hum Genet. 2006;14(7):846-52.

Roberts A. L., Thomas B.J., Wilkinson A.S., Fletcher J.M., Byers S. *Inhibition of Glycosaminoglycan Synthesis Using Rhodamine B in a Mouse Model of Mucopolysaccharidosis Type IIIA*. Ped Res 2006; 60: 309-315

Roberts AL, Rees MH, Klebe S, Fletcher JM, Byers S. *Improvement in behaviour after substrate deprivation therapy with rhodamine B in a mouse model of MPS IIIA*. Mol Genet Metab. 2007;92(1-2):115-21

Sukegawa K, Song XQ, Masuno M, Fukao T, Shimozawa N, Fukuda S, Isogai K, et al. *Hunter disease in a girl caused by R468Q mutation in the iduronate-2-sulfatase gene and skewed inactivation of the X chromosome carrying the normal allele*. Hum Mutat 1997; 10:361

Vafiadaki E, Cooper A, Heptinstall L E, Hatton C E, Thornley M, Wrait J E. *Mutation analysis in 57 unrelated patients with MPS II (Hunter's disease)*. Arch. Dis. Child. 1998; 79: 237-241

Wraith JE. *The Mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management.* Arch Dis Child 1995; 72: 263

CHAPTER 3

PROJECT 3

Efficacy and safety of treatment with N-butyl-deoxynojirimycin (NB-DNJ-miglustat) in patients with Niemann-Pick disease type C.

PHASE 1: Mono-centric study involving 4 patients enrolled at the Department of Pediatrics, Federico II University of Naples

PHASE 2: Multi-centric italian trial supported by Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), coordinated by the Department of Pediatrics, Federico II University of Naples

INTRODUCTION

BACKGROUND AND RATIONALE

Background

- Clinical phenotype and natural history

Niemann-Pick disease type C (NPC) is a rare autosomal recessive lipid-storage disorder with an estimated prevalence of about 1/120,000-1/150,000 living births.

The clinical spectrum is wide and age at onset may vary from the neonatal to adult age. Initial manifestations can be characterized by a progressive neurodegeneration or psychiatric disturbances in association with a visceral involvement with hepatosplenomegaly and lung interstitial disease.

The classical phenotype (60-70%) is characterized by late-infantile or juvenile onset (usually between 3 and 15 years of age) of typical neurological symptoms as cerebellar ataxia, developmental delay or progressive dementia, vertical sopranuclear gaze palsy, dysarthria, dysphagia, dystonia and seizures. Motor delay with hypotonia is followed by pyramidal signs and gelastic cataplexia. A variable degree of visceral involvement is usually associated. Symptoms are slowly progressive and lead to exitus within 20-30 years. The adult onset form is rarer (10%) and is usually characterized by insidious onset of psychiatric disturbances and progressive dementia.

In the infantile presentation (20%) an isolated hepatosplenomegaly may be the only sign of the disease for a number of year; neurological involvement appears later and leads to premature death. In the neonatal presentation prolonged cholestatic jaundice and severe progressive hepatosplenomegaly are the most common signs.

The neonatal and infantile forms generally have a more severe and rapidly progressive course.

Routine biochemical assays are usually normal, except in patients with hypersplenism or cholestatic jaundice. Bone marrow examination could show the presence of foam cells or sea-blue histiocytes (Patterson et al, 2001). Neuroimaging evaluation is not specific and may show cerebral and cerebellar atrophy. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging (1H-MRSI) shows a diffuse pattern of neuronal involvement and significant correlations have been found between clinical staging scale scores and 1H-MRSI abnormalities (Tedeschi et al, 1998). The electroencephalogram may show a

diffuse slowing of cerebral electric activity or a variety of epileptiform discharges. Central conduction times may be slowed in somatosensory, visual evoked and brain stem auditory evoked potentials (Patterson et al 2001, Pikus A, 1991).

- Genetics and biochemical findings

NPC is genetically heterogeneous, as it can be caused by mutations in one of two genes, NPC1 and HE1/NPC2 (Bauer et al 2002, Naureckiene et al, 2000). Mutations in NPC1 account for more than 95% of all NPC disease cases, whereas mutations in HE1/NPC2 account for the remaining 5%.

Despite at present it seems not yet clear what is the exact function of NPC1 and HE1/NPC2 proteins, it has been suggested that they work in concert to facilitate the intra cellular transport of cholesterol and possibly other lipids. In cultured cells from NPC patients the most prominent feature is a defect in the LDL-derived cholesterol trafficking with lysosomal/late endosomal accumulation of endocytosed unesterified cholesterol and delayed induction of cholesterol homeostatic reactions.

- Diagnosis

The diagnosis of NPC is suggested by clinical features and it is performed by biochemical assays showing the abnormal cholesterol storage in cultured fibroblasts by filipin-staining and the abnormal intracellular cholesterol homeostasis by impaired LDL-induced cholesterol esterification (Patterson et al, 2001). No correlation has been observed between the severity of abnormalities in intracellular cholesterol homeostasis and the clinical phenotype. Diagnosis can be confirmed by molecular analysis of NPC1 and HE1/NPC2 genes. Despite no specific serological marker has been recognized up to date, a secondary increase of plasma chitotriosidase activity has been reported (Ries et al, 2006).

- The involvement of glycosphingolipids in NPC

Although NPC has been considered for several years a cholesterol lysosomal storage disease it shares many features with other sphingolipid storage disorders as Gaucher disease, Fabry disease, GM1 and GM2 gangliosidoses and it has recently been shown that a variety of GSL accumulate in NPC cells (Vanier et al, 1999).

The lipid storage pattern is similar in NPC1 or NPC2 mutations and varies in different organs: particularly in the brain a marked increase of glucosylceramide (up to levels observed in type II Gaucher disease) and GM3 and GM2 gangliosides has been observed; in liver and spleen an increase in sphingomyelin, unesterified cholesterol and glucosylceramide has been shown, with storage of other phospholipids and glycolipids to a lesser extent.

It has recently been suggested that the defect in lipid trafficking within the endosomal-lysosomal system could involve also GSL (te Vrugte et al, 2004) and that the GSL storage could have a central role in the pathogenesis of neuronal damage.

- Therapeutic approaches

At present no disease-modifying treatment is available for NPC patients. Liver transplantation and bone marrow transplantation seemed successful in improving visceral involvement, but failed to slow neurological progression (Gartner et al 1986, Hsu et al 1999). Treatment strategies to reduce intracellular cholesterol accumulation by dietary cholesterol restriction or by cholesterol-lowering drugs have been ineffective (Patterson et al, 1993).

Rationale

-Biochemical rationale

The possible pathogenetic role of GSL storage in NPC, especially in central nervous system, is the rationale for therapeutic approaches with inhibitors of GSL biosynthesis, that are able to cross the blood-brain-barrier (BBB). Miglustat is a small iminosugar that can cross the BBB and it is a known inhibitor of glycosidases and ceramide-specific glucosyltransferases. It was initially developed as an antiviral drug for the treatment of patients with AIDS (Tierney et al, 1995). Miglustat is a reversible inhibitor of glucosylceramide synthase which catalyses the first committed step in the GSL biosynthetic pathway. Miglustat has been proposed as a substrate-reducing agent and approved for Gaucher disease therapy in humans. In principle, the same inhibitory effect on the synthesis of GSL may be useful for the treatment of other disorders, including gangliosidoses GM1 and GM2 and NPC.

-Pre-clinical studies

In studies of murine and feline models of NPC disease, reduction of GSL accumulation with miglustat treatment delayed the onset of neurological symptoms and increased life-span (Zervas et al, 2001).

Decreased levels of gangliosides in the cerebral cortex of the treated animals have been shown. Furthermore treatment with miglustat prevented glycolipids accumulation and the associated neuropathology in mouse models of different lysosomal storage disorders (LSD) as Tay Sachs (Platt et al, 1997) and Sandhoff disease (Jeyakumar et al, 1999).

-Current experimental trials

Substrate reduction therapy (SRT) with miglustat has proved an effective therapeutic strategy in Gaucher disease (Cox et al, 2000, Elstein et al 2004) and treatment with miglustat has been approved for adult patients with moderate Gaucher disease unsuitable for ERT in USA, Israel and Europe.

Correction of several aspects of the abnormal cell biology, including cholesterol trafficking and accumulation of GSL, has also been demonstrated in an adult patient with NPC disease treated with miglustat for six months (Lachmann et al 2004).

At present a phase II/III clinical trial, designed to allow evaluation of the safety and efficacy of miglustat in adult, juvenile and paediatric patients with NPC disease, is in progress at the New York Columbia University (USA) and at the Manchester Royal Children's Hospital (UK). Twenty-nine adult and juvenile patients have been enrolled: 20 patients were assigned to the miglustat group (treated with 200 mg three times a day) and 9 patients to the control group. A group of 12 patients aged under 12 years has been included in a separate substudy and received miglustat at a dosage adjusted for body surface area. Encouraging results of the first year of treatment have been recently published (Patterson et al, 2007).

In this study we are planning to verify the efficacy and safety of treatment with miglustat in 4 paediatric patients with NPC disease for which no effective treatment is available at present. As the mentioned current trial has enrolled a small number of patients and also considering that NPC patients have clinical and genetic heterogeneity (two different genes and different mutations), it seems crucial to collect as much experience as possible to establish the efficacy of this therapeutic approach and the optimal therapeutic regimen in different patients.

The proposed treatment might be effective in stopping the progression of neurological involvement and this may be relevant also for the Italian National Health Service (SSN) in terms of prevention of disease and handicap.

PHASE 1: Mono-centric study involving 4 patients enrolled at Department of Pediatrics, Federico II University of Naples

AIM OF THE STUDY

In this study we aimed to verify the efficacy and safety of treatment with N-butyl-deoxynojirimycin (NB-DNJ, Miglustat - Zavesca®) on several manifestations of NPC disease in paediatric patients.

PATIENTS AND METHODS

Four pediatric patients with NPC were recruited in an observational study at Department of Pediatrics, Federico II University of Naples.

The diagnosis of NPC was performed by biochemical testing, showing intracellular accumulation of unesterified cholesterol after challenge with lipoprotein-enriched medium (visualized by histochemical staining with filipin) and deficiency of intracellular esterification of exogenous lipoprotein-derived cholesterol, and/or by molecular analysis of NPC1 and HE2/NPC2 genes.

Results of biochemical and molecular analysis, age and clinical features of patients at baseline have been summarized in table 1.

Written informed consent was obtained from patients' parents and the study was approved by the local ethical committee.

Cases 1, 2, 3 and 4 started therapy respectively at 12 years, 10 years, 9,5 years and 11 months of age. Case 2 is the younger sister of case 1. Case 4 is the younger brother of a NPC patient dead at age of 12 months, due to respiratory insufficiency.

All patients received miglustat orally with dosage adjusted for body surface area (250 mg/mq/day divided in three doses) respectively for 18 months (cases 1, 3) 21 months (case 4) and 12 months (case 2).

Periodic assessments included biochemical, clinical physical and instrumental examinations. The outcome measures were assessed by the same investigator at each time in the study.

Neuro-developmental assessments were performed by a paediatric neurologist and a psychologist and included neurological examination, mental and cognitive status evaluation by Griffith's Mental Development Scale (GMDS) or by Wechsler Intelligence Scale for Children-Revised (WISC-R) according to the age and the general conditions of the patients.

The degree of disability was assessed using the Pediatric Evaluation of Disability Inventory (PEDI). The Scaled Score provided an estimate, regardless of age, of the child's functional performance along a continuum of items scored from 0 to 100.

An adjunctive attempt to measure the general motor skills of patients and the ambulation ability was also achieved assigning a score according to the Walton and Gardner-Medwin scale. This is an 11-points ordinal scale ranging from grade 0 (patient performing all activities) to grade 10 (patient confined to bed and requiring help for all activities).

EEG and nerve conduction velocity studies as Brainstem Auditory Evoked Potentials (BAEP), Visual Evoked Potentials (VEP), Somato-Sensorial Evoked Potentials (SSEP), Motor Evoked Potentials (MEP) were performed in agreement with collaboration and clinical conditions of patients.

The coordination of swallowing was assessed periodically by videofluoroscopy; liver and spleen size were measured using abdominal MRI and/or abdominal ultrasound, in agreement with patient collaboration.

Respiratory assessment was performed by clinical evaluation of symptoms, respiratory rate, number of infections, oxygen saturation and oxygen supply dependency and by chest X-ray. A lung HRCT evaluation has been performed only in case 4, showing a severe involvement, at baseline and after 15 months of therapy.

The serum chitotriosidase levels were periodically assessed to investigate a possible correlation with therapy.

Biochemical analyses included full blood count, serum levels of alanine transaminase, aspartate transaminase, bilirubin, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase, creatinine, total proteins, albumin, LDL and HDL cholesterol, triglycerides, coagulation parameters, vitamin B12, folic acid and urine analysis.

Adverse events were assessed at each study visit by direct questioning.

Patients continued to take concomitant medications such as antibiotics, antiepileptic drugs and, occasionally, anti-diarrhoeal agents. A lactose-free diet has been administered at the same time of the start of treatment.

Table 1.

		<i>Patient</i>			
		<i>1 RG1</i>	<i>2 RG2</i>	<i>3 GA</i>	<i>4 OM</i>
Biochemical testing	Filipin staining (Controls : No or very few fluorescent perinuclear vesicles)	Strong accumulation of fluorescent perinuclear vesicles	Massive accumulation of fluorescent perinuclear vesicles	Massive accumulation of fluorescent perinuclear vesicles	Not done
	Intracellular esterification of exogenous lipoprotein-derived cholesterol Controls: 2950±1200	60	< 10	< 10	Not done
Molecular analysis	NPC1	p.R934X/?	p.R934X/?	p.I1061T/Q921P	-
	NPC2	-	-		p.E20X/E20X
Age at onset		8 years	9 years	1 month	1 month
Neurological symptoms at baseline	Psychomotor delay or regression	+	-	++	++
	Dysarthria	+	+	+	-
	Dysmetria	+	+	+	-
	Ataxia	+	-	+	- (not ambulant)
	Vertical and horizontal sopranuclear gaze palsy	-	-	+	-
	Dystonia	+	-	+	-
	Pyramidal signs	-	-	+	-
	Epilepsy	-	-	+	-
	Caplexy	-	-	+	-
	Narcolexy	-	-	-	-
	Enuresis/incont.	-	-	+	+
Age < 3 years	Social smile				+
	Head control				+
	Sitting				-
	Unsupported standing				-
	Autonomous walking				-
	Speech delay				+
Visceral involvement at enrolment	Hepatosplenomegaly	+	+	+++	+++
	Hepatopathy	-	-	+	++
	Lung interstitial disease	+	+/-	+++	+
	Respiratory insufficiency and oxygen need	-	-	-	+

RESULTS

Neurological physical assessment

Case 1 showed stabilization of neurological physical examination compared to baseline, apart from the presence of mild pyramidal signs with increased deep tendon reflexes. Nevertheless she manifested onset of epilepsy after 6 months of treatment with uncontrolled seizures, transient worsening of the general conditions, dystonia, dysphagia, loss of ability to walk and to speak. After the control of seizures was reached with appropriate treatment with oxcarbamazepine and sodium valproate, neurological examination seemed strikingly improved.

Case 2, who started therapy earlier and at better baseline conditions, showed absence of progression of neurological involvement.

Case 3 showed a slow progression of symptoms with increased hypotonia, tremors, pyramidal signs, dysmetria, more impaired ambulation and severe speech difficulty. The language appeared poorer, unintelligible and inappropriate.

Case 4, the younger patient, showed an astonishing improvement of motor development reaching sitting position after six months of treatment and gradually ameliorating the social behaviour.

Mental and cognitive status

Similarly to neurological physical examination case 1 and 3 showed a mild worsening of psychometric scores, while stop of regression and improvement in developmental age have been detected in case 2 and 4 respectively.

Results of psychometric evaluations have been summarized in fig 1 and 2.

Disability

The degree of disability seemed to be steady or improve in each patient. In case 1 a severe worsening was detected after 6 months of therapy in combination with the onset of epilepsy, with a subsequent recovery to the previous condition; case 3 steadily showed a significant degree of disability.

Case 2 had a Pediatric Evaluation of Disability Inventory score within normal range through the whole follow-up period, showing a slight progress particularly in the social function and self care domains.

Case 4 showed a severe degree of disability without any significant worsening during therapy (Figure 3).

Walton and Gardner-Medwin scale scores

The scores assigned according to the Walton-Gardner and Medwin scale appeared stable compared to baseline in case 1, 2 and 3 while a better scoring was recorded in case 4 by month 6 of treatment, which was sustained up to month 21 (fig. 4).

Electrophysiological studies

Evoked potentials as visual (VEPs), brain auditory (BAEPs), motor (MEPs) and somatosensory (SSEPs), used to measure the electrical activity in different areas of the brain and spinal cord, were administered to patients according to their ability to collaborate and to their clinical conditions. Overall the periodic assessment showed a variable improvement in all patients.

Particularly, BAEPs improved in case 1 and 2 and showed a normal evolution in the younger patient (case 4). VEPs resulted normal after 12 months of treatment in case 3.

Results of electroencephalography appeared variable in different patients: case 1 developed epilepsy after 6 months of treatment with poor control of seizures by medications. EEG showed status epilepticus for a few days. We did not consider this adverse event as drug related, but likely a manifestation of the natural course of the disease.

Case 3 showed onset of epilepsy one year before treatment. A transient worsening of EEG was detected in combination with poor control of seizures.

In case 2 and case 4, who didn't show epilepsy, EEG appeared stable.

Swallowing

A videofluoroscopy of swallowing, by administering liquid barium with a spoon or a cup was performed in each patient at baseline and every six months by the same radiologist unaware of the treatment.

Swallowing coordination of oral, glosso-pharyngeal, esophageal phases and reflux of barium in airways were assessed, assigning a score to the degree of incoordination, ranging from mild to severe.

All patients showed early improvements in swallowing ability as summarized in table 3. Case 4 showed severe swallowing difficulties at baseline. Parents refused the supportive treatment by percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG). A dramatic improvement was detected 6 months later, persisting up to month 21; at the same time the child began to grow up.

Case 1 experienced a transient worsening in combination with status epilepticus, needing a PEG to feed. After the control of seizures was reached an improvement of swallowing was newly detected, with normal deglutition after 18 months of treatment.

Visceromegaly

Liver and spleen size have been assessed during treatment by abdominal MRI in two collaborating patients (case 1 and 2) and by ultrasound in the other patients (case 3 and 4).

No evidence of improvement during treatment has been showed in each patient (fig. 5).

Respiratory function

Respiratory assessment steadily showed absence of respiratory symptoms in cases 1, 2 and 3, without any significant change of the mild interstitial involvement showed at the chest X-ray evaluation

In agreement with previously described patients with the rare HE1/NPC2 gene mutations case 4 showed an infantile phenotype with a severe lung involvement (Schofer et al, 1998). Respiratory assessment evidenced respiratory insufficiency and no change in the need of oxygen supplementation and in the frequency of respiratory infections during the follow-up period. While the chest X-ray images showed steady diffuse ground glass density, a lung HRCT evaluation, performed at baseline and after 15 months of therapy, evidenced a significantly decreased alveolar filling after treatment, while severe emphysema, thickening of septa and fibrosis persisted unchanged (fig. 6). At baseline the absence of fever and cough, the normal values of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein and the normal white blood count did not suggest a diagnosis of pneumonia.

Chitotriosidase

Serum chitotriosidase levels showed no correlation with therapy.

General conditions and global outcome

A significant improvement was noted in case 4 and a stabilization of the symptoms was detected in case 2 who started the therapy before a significant neurological deterioration occurred.

Case 1 showed a sudden but transient worsening of general conditions in combination with the onset of epilepsy. Subsequently her general conditions partially recovered and seemed unchanged as compared to baseline.

Case 3 was already at a severe stage of disease at baseline. Over the 18-month treatment period she showed a slow progression of neurological deterioration.

In case 4 general conditions were critical at baseline due to a significant neurological impairment, the life-threatening respiratory failure and the severe malnutrition.

Baseline weight, length and head circumference were all below the 5th centile (Kg 5.700, cm 67 and cm 40.5 respectively, at 11 months of age).

It is noticeable that during treatment, a gradual improvement in growth parameters was observed and, at month 21, his weight was Kg 11.800 (between the 5th and the 10th centile), head circumference was cm 47 (between the 10th and the 25th centile), whereas length persisted below the 5th centile (fig.7).

Safety evaluation

No significant change of biochemical analyses was observed.

Case 1 and 2 showed a transient weight loss. Case 2 experienced a few drug related adverse events from week 4 of treatment, consisting of abdominal pain and episodes of diarrhea.

Case 1 and 3 showed seizures that were considered to be likely related to the natural course of the disease.

DISCUSSION

This observational study reports on the use of miglustat in 4 pediatric patients with NPC, focusing on the efficacy on neurological and visceral manifestations of the disease. Miglustat has been suggested as a potential treatment for NPC disease, but little information about the effects of this drug is currently available in the literature.

Only a single controlled trial has been reported to date, enrolling a small sample of NPC patients during a yearly follow-up, showing wide age range (more than 12 years-adulthood) and presenting variable clinical manifestations at baseline. A subgroup of 12 pediatric patients has been studied in the absence of a control group.

Given the phenotypic variability of this condition and the limited number of patients on treatment, further experiences, even single observations, may provide useful information on the efficacy of miglustat.

Consistent with the ability of miglustat to cross the blood-brain-barrier, our data confirm that substrate reduction may have some efficacy in modifying the natural course of neurological involvement in NPC disease; moreover, our study adds information about visceral involvement, particularly on lung disease and confirms the safety of this treatment in pediatric patients.

Concerning neurological involvement variable results have been seen in the four observed patients. Case 2 showed no progression in terms of neurological physical examination, motor skills and cognitive ability. Case 4 had significant progress in each area of the psychomotor development. Nevertheless, he reached a plateau in motor and speech skills at around month 12 and neither major improvement nor decline in these areas was subsequently noted (Figure 2).

With the exception of a transient impairment of her conditions due to epilepsy, case 1 showed a substantial stabilization of her neurological conditions and motor skills but a mild cognitive decline in comparison to baseline. Case 3 showed a slow progression of symptoms.

A few different factors might explain the different neurological outcome of the observed cases.

First the phenotypic clinical variability of the disease and the heterogeneity of the neurological damage at baseline are likely to impact on the outcome of the patients. Overall, our data have shown a stabilization or a mild progress in each patient. In this respect, it should be mentioned that even a small improvement or stabilization of disease course may improve or maintain patient's quality of life, decreasing or stabilizing the degree of disability.

Progressive swallowing deterioration with subsequent complications as malnutrition and aspiration is a typical feature in NPC disease.

In agreement with the results of the trial the improvement of swallowing is the most evident effect of the treatment with miglustat in our patients.

An improvement or stabilization of swallowing ability could have immediate effects on the quality of life, can contribute to ameliorate the general status of the affected patients and to prolong their survival, decreasing the risk of aspiration.

In contrast with the published trial, in our study the evaluation of the swallowing with videofluoroscopy has also allowed to appraise the effects of the treatment on the different phases of the swallowing. Anatomically, swallowing has been divided into three phases: oral, pharyngeal and esophageal. Functionally, it may be divided into preparatory, transfer and transport phases, that follow each other in a sequence. The act of swallowing is a highly regulated activity, having voluntary and involuntary components. While the preparatory/oral phase includes conscious effort to ingest food, being activated by peripheral receptors and also by stimulation of certain cortical neurons, the pharyngeal and esophageal phases are mediated by an involuntary reflex that involves a swallowing pattern generator in the brainstem (Raj et al, 2006 ; Detlef et al, 2006).

Our data show mainly an improvement of the pharyngeal and esophageal phases, while a mild defect of the preparatory/oral phase persists in two of three patients having swallowing impairment.

This suggests a greater effect of the treatment on selected neurons of the brainstem (which control the autonomic phases of deglutition).

The hypothesis of a selective efficacy of miglustat on some neurons of the brainstem is in agreement with other results, as are the improvement of the auditory acuity shown in the international trial and the improvement of the brainstem auditory evoked potentials observed in our patients, due to the reduction of damage in the central acoustic pathway at brainstem level. This hypothesis is also consistent with the improvement of the sopranuclear gaze palsy shown in the international trial, as vertical and horizontal saccades are under the control of separate systems of the brainstem (Bhidayasiri et al, 2000; Hanson et al, 1986; Leigh, et al, 1999).

Although the lesions of NPC occur throughout the CNS, it is presently known that certain regions, among which some brainstem nuclei, are susceptible to early and severe injury. It is therefore reasonable to suppose a more evident effect of the treatment just on the neurons of such regions.

Despite some efficacy of the treatment has been shown on neurological manifestations, little or no improvement of visceral involvement has been evidenced, neither in liver and spleen size nor in respiratory function. In particular, concerning respiratory status, our case 4, who manifested the most severe involvement, didn't show any remarkable decrease of the frequency of lung infections and any significant reduction in the need of respiratory support after therapy was started. Anyway, this patient is the younger brother of a NPC patient who died of respiratory failure at the age of 11 months. Considering the early fatal pulmonary involvement in his elder brother, one could speculate that the unchanged respiratory conditions during the whole follow-up period and his surviving at the present age of 3 years may represent the effect of the treatment. Moreover, excluding the presence of pneumonia at the same time of the HRCT baseline evaluation (based on the absence of increased inflammatory indexes or fever) the significant reduction of the lung opacity after 15 months of therapy could suggest a reduction of intra-alveolar storage. A more prolonged follow-up and the study of further patients are necessary to clarify this point.

In case 4, despite the severe respiratory insufficiency, a dramatic change in growth parameters, probably due to the better swallowing and general conditions have been observed a few months after the start of treatment.

While microcephaly was consistently observed before therapy, an improvement of the head circumference percentile has been evidenced together with a progression of psychomotor abilities.

This is the first description of a patient with HE1/NPC2 gene mutation, performing substrate reduction therapy. Our observations suggest that the improvement of some manifestations could be obtained also in this rare subgroup of patients.

Considering the need of useful serological markers we also investigated whether chitotriosidase plasma levels correlate with the severity of the disease and the clinical response to treatment. Chitotriosidase is a human chitinase with markedly elevated activity in a variety of LSDs. It is secreted by activated macrophages and it is usually increased in the plasma of patients with Gaucher disease, which makes it a useful marker for this disease. Plasma levels of chitotriosidase correlate with the efficacy of treatment in Gaucher disease. As a less marked increase in chitotriosidase activity is also found in Nieman-Pick disease we assessed the chitotriosidase activity in our NPC patients to evaluate its potential use as a tool to monitor therapy (Ries et al, 2006). Our data failed to show any significant correlation with response to treatment.

Finally, we registered a few adverse events which were consistent with the safety profile previously described.

In conclusion our observations provide additional information on the efficacy and safety of the substrate reduction therapy with miglustat in NPC disease, suggesting that miglustat can provide therapeutic benefits in CNS symptoms and allows stabilization of some manifestations of the disease in childhood-onset NPC. We also hypothesized that this experimental therapeutic approach could prevent neurological regression and disability and lead to improvement of the quality of life in NPC patients who start the therapy before significant damage has occurred. Further follow-up is crucial to define the long-term maintenance of these effects.

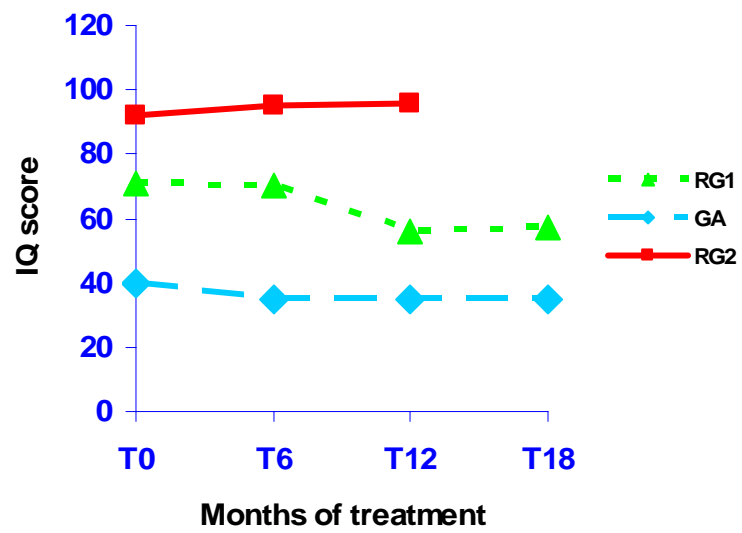


Fig. 1 Intelligence Quotient (IQ) evaluation by WISC-R in cases 1, 2 and 3.

CASE 4

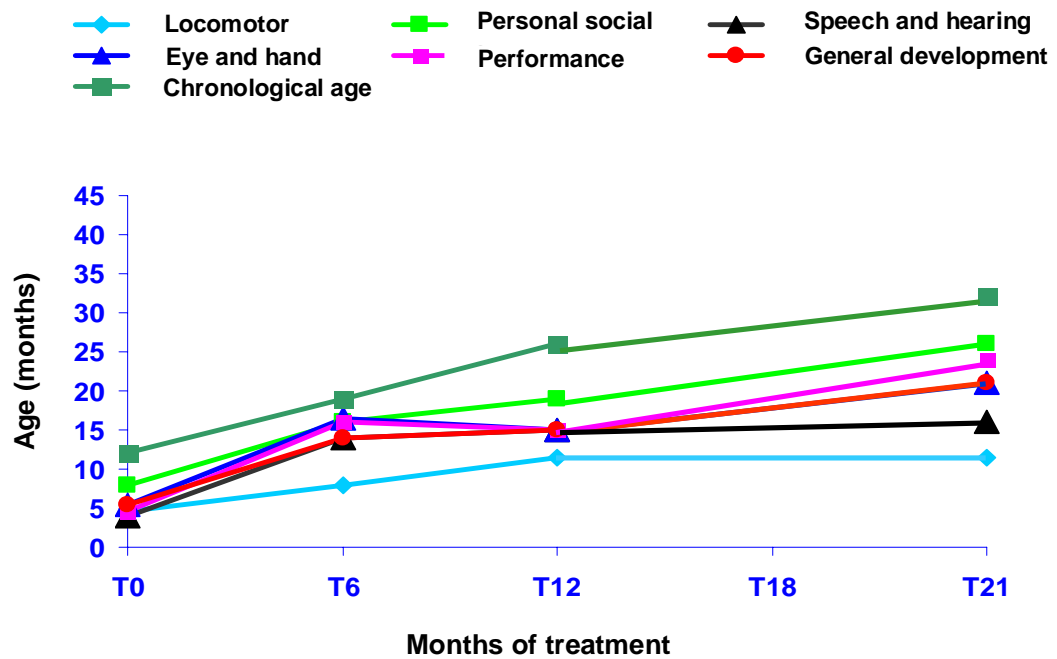


Fig. 2 Developmental age by GMDS Subscales in case 4.

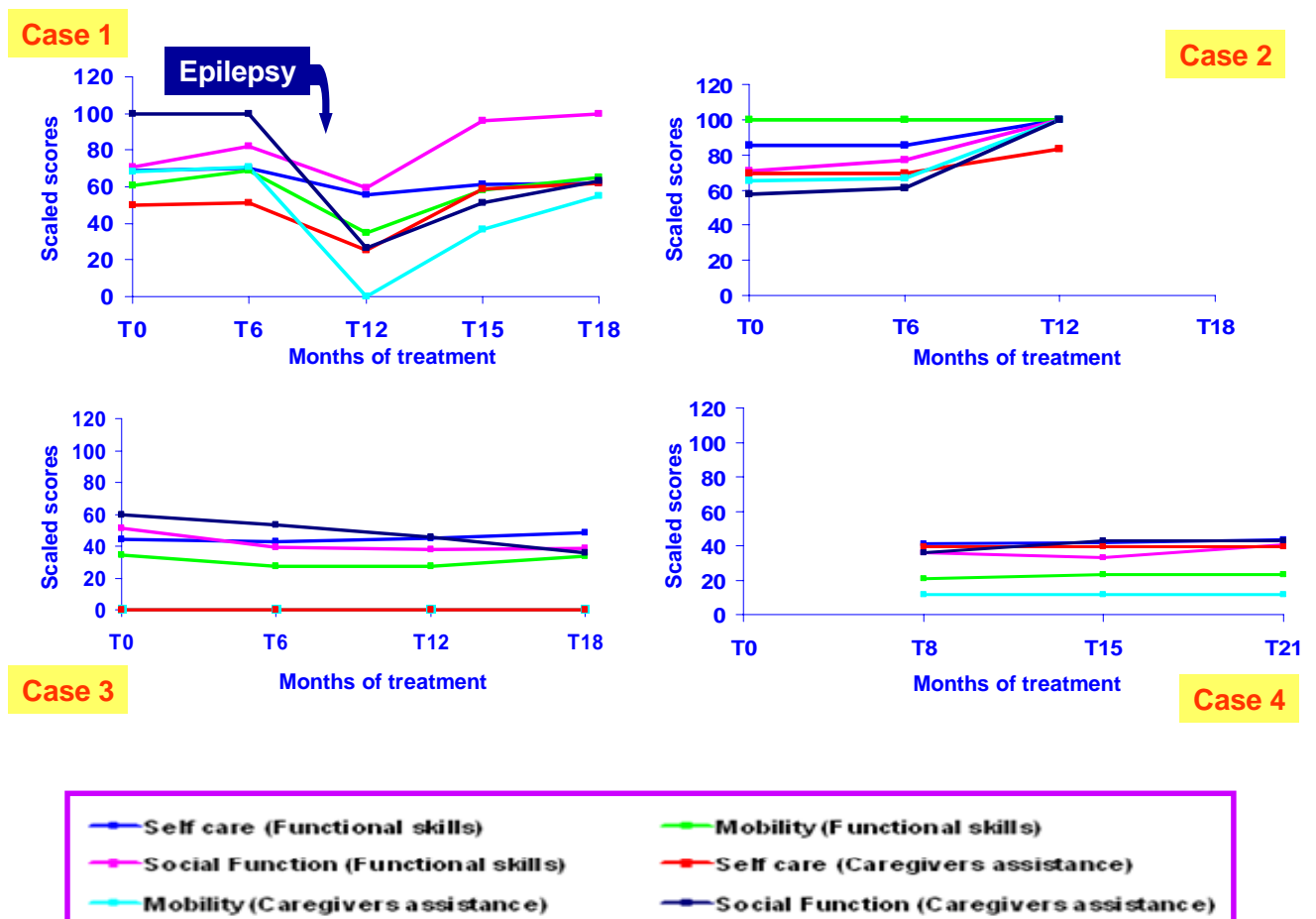


Fig. 3 Disability assessed by PEDI

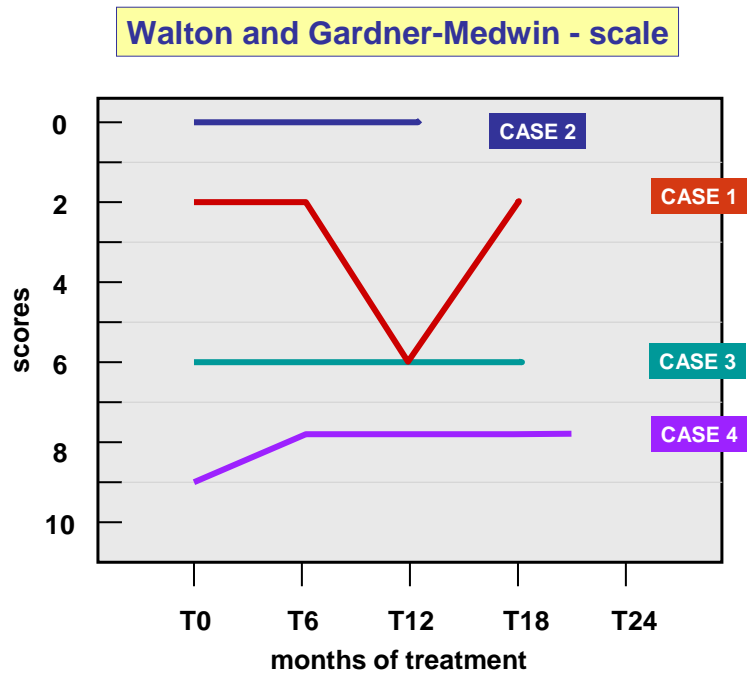


Fig. 4 Walton and Gardner-Medwin scores

	Baseline	6 months	12 months	18-21 months
Case 1	Mild incoordination of oral phase	Moderate incoordination of oral and pharyngeal phases	PEG	Normal deglutition (t18)
Case 2	Normal swallowing	Normal swallowing	Normal swallowing	-----
Case 3	Moderate incoordination of oral, pharyngeal and esophageal phases Reflux of barium in airways	Mild incoordination of oral phase	Mild incoordination of oral phase	Mild incoordination of oral phase (t18)
Case 4	Severe incoordination of oral, pharyngeal and esophageal phases Reflux of barium in airways	Mild incoordination of oral phase	Mild incoordination of oral phase	Mild incoordination of oral phase (t21)

Table 3. Results of videofluoroscopic assessment of deglutition

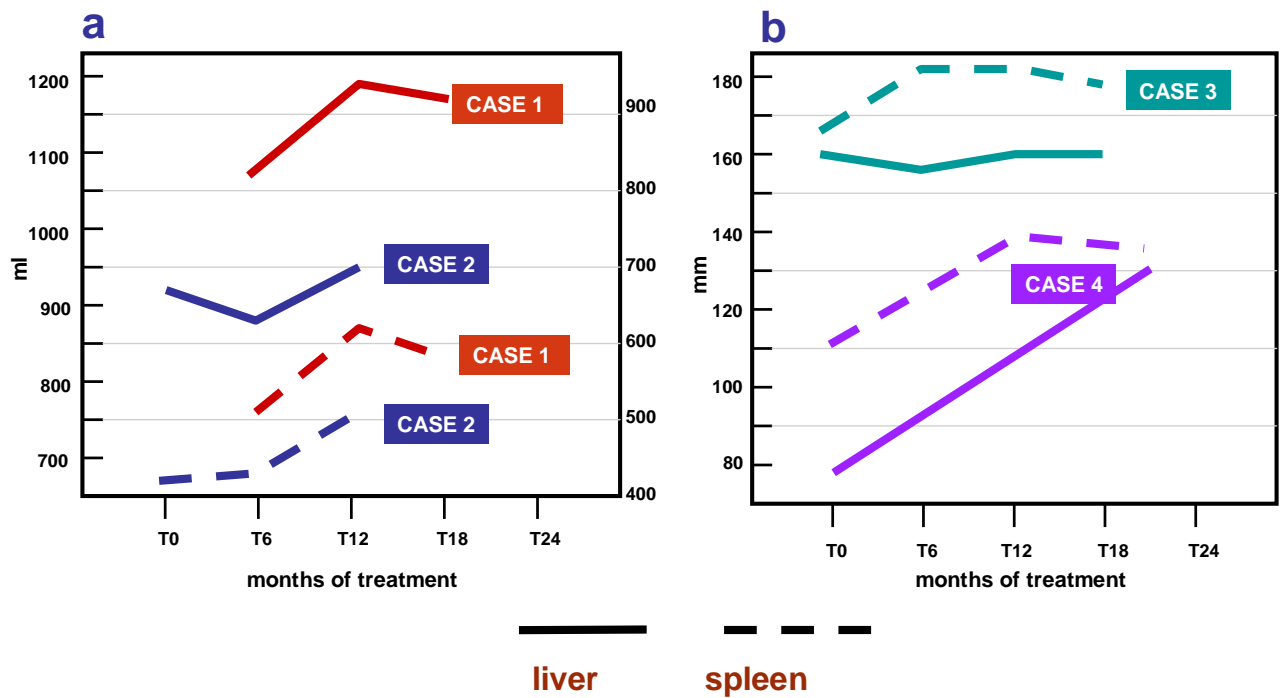


Fig.5 Liver and spleen size assessed by MRI in case 1 and 2 (as volume) and by ultrasound in case 3 and 4 (as longitudinal diameter of liver right lobe and spleen)

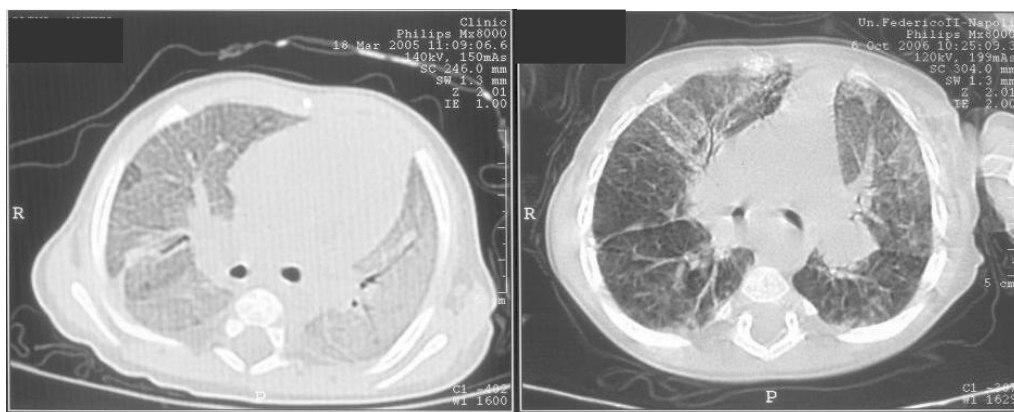


Fig. 6 HRCT scans before (a) and after treatment (b) show diffuse ground glass opacity, fibrosis and septal thickening; fig. b shows decreased alveolar filling after treatment.

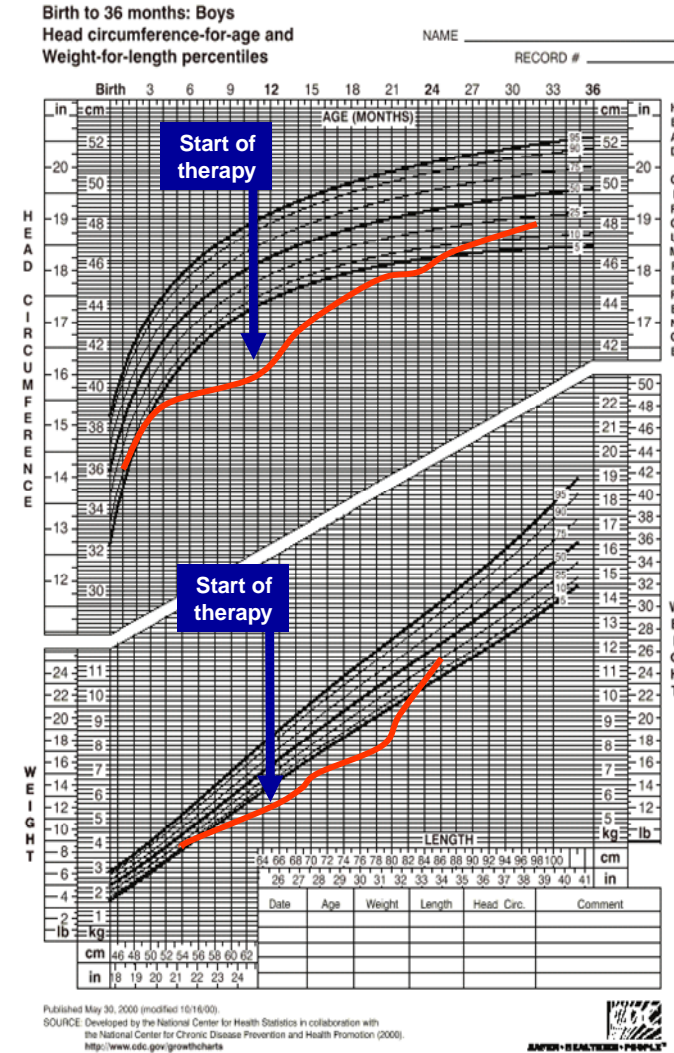
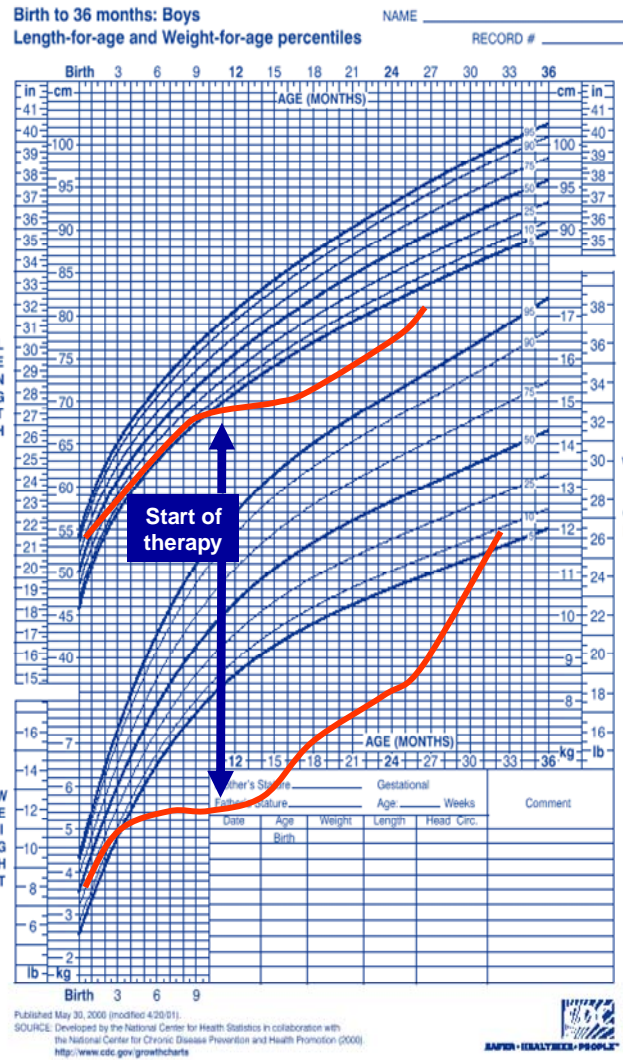


Fig.7 Growth parameters in case 4

PHASE 2: multi-centric italian trial supported by AIFA

AIM OF THE STUDY

In this study we are planning to verify the efficacy and safety of treatment with N-butyl-deoxynojirimycin (NB-DNJ, Miglustat - Zavesca®) in a wide italian population of patients with NPC disease.

PATIENTS AND METHODS

Nineteen italian patients with NPC have been enrolled in the study. At the time of enrolment an informed consent have been signed by patients or their parents/legal tutors and inclusion/exclusion criteria have been checked. As the NPC is rare and is clinically and genetically heterogeneous, enrolled patients have wide age range (between 1-25 years) and variable clinical phenotype. The clinical phenotype at baseline have been assessed after enrolment. Molecular analysis of the NPC1 and HE/1NPC2 genes have been performed if not already available.

Patients were included if they had a diagnosis of NPC confirmed by biochemical tests (filipin staining and LDL-cholesterol esterification) and/or molecular analysis.

Patients were excluded if they were unable to take the drug, had bad compliance to study procedures or if they showed renal failure. Indeed fertile women that did not consent to contraception could not participate.

This is a single arm, open label, clinical trial. According to data showing the presence of miglustat in cerebro-spinal fluid (CSF) with plasma/CSF ratio of 20% and similarly to the dosage used in the current international trial supported by Actelion, adult patients received 200 mg t.i.d. of miglustat orally.

A dosage adjusted for body surface area (250 mg/mq/day) have been administered to patients younger than 18 years.

OUTCOMES

Stabilization or improvement of the neurological involvement and of the swallowing abnormalities were chosen as primary outcomes.

Stabilization or improvement of the electrophysiological parameters, saccadic eye movement velocity, respiratory involvement, liver and spleen volumes and quality of life were considered secondary outcomes.

PROCEDURES FOR THE ASCERTAINMENT OF OUTCOMES

The outcomes and the procedures have been selected to reflect the clinical heterogeneity of NPC patients. Due to this reason we have considered as "not obligatory" procedures that could be not applicable to non-collaborative patients. We have considered as "obligatory" all examinations that are needed to evaluate the primary efficacy endpoints.

Full neurological examination, psychometric tests selected on the basis of age and cognitive ability of the patient as Griffith's mental scale, test di Baley, test di Wechsler-Bellevue (WIPPSI, WISC-R, WAISS), evaluation of motor function and disability using standard scales as Walton and Gardner-Medwin scale and PEDI scale were considered obligatory.

Different parameters as nerve conduction velocity studies, full hearing assessment, horizontal and vertical saccadic eye movement velocity and visual acuity, electroencephalography, electromyography, morphologic brain MRI evaluations and 1H-MRSI with measurement of N-acetylaspartate (NA), choline (Cho) containing compounds, creatine plus phosphocreatine (Cre) signal intensities, or, alternatively, brain PET were explored in collaborative patients to verify some secondary outcomes.

The ability to swallow was assessed at baseline and every six months. Patients were asked to swallow the 5 mL of water, 1 teaspoon of puree, 1 teaspoon of soft lumps (little pasta), or a third of a cookie.

For each substance, swallowing ability have been evaluated using a 5-point scale, according to whether the patient had no problems swallowing, mild, moderate or severe problems, or cannot swallow the substance at all.

An additional evaluation by videofluoroscopy was performed according with patient's clinical condition and collaboration.

Further investigations were performed to verify secondary outcomes as abdominal MRI and/or abdominal ultrasound to evaluate liver and spleen size; chest X-ray and clinical evaluation of symptoms, respiratory rate, number of infections, oxygen saturation and oxygen supply dependency to define the severity of respiratory involvement; full physical examination and auxological parameters to assess general clinical conditions and growth; haematological and biochemical organ function tests, registration of concomitant therapies and adverse events and slit lamp examination to assess safety; serum chitotriosidase levels to explore a possible correlation with the response to

treatment; quality of life using standard questionnaire as SF36 for adults and CHQPF50 for juvenile patients, children and adults with mental delay.

RESULTS

This trial is currently in progress.

Partial results cannot be summarized in this section due to the agreement with Agenzia Italiana del Farmaco, that supported this clinical trial.

Primary and secondary efficacy will be established on the basis of changes in parameters used in the full assessment of patients.

Safety will be evaluated monitoring adverse events and considering changes in physical or biochemical parameters.

STATISTICAL ANALYSIS

The intention-to-treat population will be used for the analysis of clinical outcomes. The population for safety analysis will include all patients who received at least one dose of miglustat in the study. Baseline demographic and background variables will be summarized. In general, continuous variables will be summarized with descriptive statistics (n, mean, median, standard error, minimum and maximum). Categorical variables will be summarized in a table by the frequency and percentage of patients in each category. Each continuous variable will be quantified as a mean change + standard deviation from baseline. All hypothesis testing will be two-sided and will be performed at the 0.05 level of significance. For continuous variables (peak times and amplitudes of evoked potentials, peak velocity and latency of saccadic eye movements, measure of liver and spleen volumes or longitudinal diameters, value of biochemical parameters) the change from baseline value will be tested for statistical significance by paired t-test. The change for categorical variables will be analysed by appropriate methods (chi-square test). The null hypothesis for each variable will be that there is no difference in the change from baseline. The alternative hypothesis will be that there is a change in either direction from baseline. Any statistically significant changes or lack of change in the variable over time will be interpreted in relation to its clinical relevance. For example, a lack of change over time may be interpreted as a stabilization of the patient's clinical status and a beneficial outcome. Safety variables will include changes from baseline in physical examinations, incidence of reported adverse experiences and changes in laboratory parameters. Safety will be assessed using descriptive statistics. No formal statistical testing of safety variables will be performed.

REFERENCES

- Bauer P, Knoblich R, Bauer C et al. *NPC1: complete genomic sequence, mutation analysis and characterization of haplotypes. Hum Mut* 2002; 19: 30-38
- Bhidayasiri R, Plant GT, Leigh RJ. *A hypothetical scheme for the brainstem control of vertical gaze. Neurology.* 2000;54(10):1985-93
- Cox T, Lachmann R, Hollak C. *Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. Lancet* 2000; 355: 1481- 1485
- Detlef Bieger, M.D and Winfried Neuhuber, M.D. *Neural circuits and mediators regulating swallowing in the brainstem. GI Motility online* (2006)
- Elstein D, Hollak C, Aerts JM et al. *Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, N-butyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease. J Inherit Metab Dis.* 2004;27(6):757-66.
- Gartner JC, Bergman I, Malatack JJ et al. *Progression of neurovisceral storage disease with supranuclear ophtalmoplegia following orthotopic liver transplantation. Pediatrics* 1986; 77: 104
- Hanson MR, Hamid MA, Tomsak RL, Chou SS, Leigh RJ. *Selective saccadic palsy caused by pontine lesions: clinical, physiological, and pathological correlations. Ann Neurol.* 1986;20(2):209-17
- Higgins JJ, Patterson MC, Dambrosia JM et al. *A clinical staging classification for NPC. Neurology* 1992; 42(12): 2286-90
- Hsu YS, Hwu WL, Huang SF et al. *NPC a cellular cholesterol lipidosis, treated by bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 103 -107
- Jeyakumar M, Butters TD, Cortina-Borja et al. *Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. Proc. Natl. Acad. Sci* 1999; 96: 6388-6393
- Lachmann RH, te Vruchte D, Lloyd-Evans E et al. *Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in NPC. Neurobiol of disease* 2004; 16: 654-658
- Leigh, R.J., and Zee, D.S. *The Neurology of Eye Movements*, 3rd edition. Oxford University Press, Oxford, England, 1999; p. 499
- Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H et al. *Identification of HE1 as the second gene of NP C disease. Science* 2000; 290:2298-2301
- Patterson MC, Di Bisceglie AM, Higgins JJ et al. *The effect of cholesterol-lowering agents on hepatic and plasma cholesterol in NPC. Neurology* 1993; 43: 61-64
- Patterson M, Vanier MT, Suzuki K et al. (2001). *The Niemann-Pick disease type C. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill*

Patterson MC, Vecchio D, Prady H, Abel L, Wraith JE. Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol.* 2007;6(9):765-72.

Pikus A. Audiologic profile in NPC. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 630: 313 – 4

Platt FM, Neises GR, Reinkensmeier G. Prevention of Lysosomal Storage in Tay-Sachs mice treated with N-Butyldeoxynojirimycin. *Science* 1997; 276: 428-431

Raj K. Goyal, M.D. and Hiroshi Mashimo, M.D., Ph.D. Physiology of oral, pharyngeal, and esophageal motility. *GI Motility online* (2006)

Ries M, Schaefer E, Lührs T, Mani L, Kuhn J, Vanier MT, Krummenauer F, Gal A, Beck M, Mengel E. Critical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann-Pick disease type A/B and C. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29(5):647-52.

Schofer O, Mischo B, Püschel W, Harzer K, Vanier MT. Early-lethal pulmonary form of Niemann-Pick type C disease belonging to a second, rare genetic complementation group. *Eur J Pediatr.* 1998;157(1):45-9.

Tierney M, Pottage J, Kessler H et al. The tolerability and pharmacokinetics of N-butyl-deoxynojirimycin in patients with advanced HIV disease (ACTG 100): the AIDS Clinical Trial Group (ACTG) of the National Institute of Allergy and Infectious Disease. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrov* 1995; 10: 549-53

Tedeschi G, Bonavita S, Barton NW et al. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in the clinical evaluation of patients with NPC. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65: 72-79

te Vrugte D, Lloyd-Evans E, Veldman RJ et al. Accumulation of glycosphingolipids in NPC disease disrupts endosomal transport. *J Biol Chem* 2004

Vanier MT. Lipid changes in NPC brain: personal experience and review of the literature. *Neurochem Res* 1999; 24: 481-48

Zervas M, Somers KL, Thrall MA et al. Critical role for glycosphingolipids in NPC. *Current Biology* 2001; 11: 1283-1287

Chapter 4

Attached papers and communications to congresses about lysosomal storage disorders

G. Parenti, D. Melis, M. Rossi, **S. Fecarotta**. *Novità nel campo delle malattie metaboliche ereditarie*. Prospettive in Pediatria. 2005: 35: 181-192

Fecarotta, Rossi, Cotugno, Gabrielli, Rovelli, Scarpa. Raccomandazioni per la mucopolisaccaridosi di tipo I (m. di Hurler-Scheie). Online publication (in press) in the SISMME website

Fecarotta, Rossi, Di Rocco, Parini, Parenti. Raccomandazioni per mucopolisaccaridosi di tipo II (m. di Hunter). Online publication (in press) in the SISMME website

Fecarotta, Rossi, Auricchio, Barone, Scarpa. Raccomandazioni per il monitoraggio e trattamento di pazienti affetti da Mucopolisaccaridosi di tipo 6. Online publication (in press) in the SISMME website

Fecarotta, Rossi, Dionisi-Vici, Bembi, Andria. Raccomandazioni per la malattia di Niemann-Pick di tipo C. Online publication (in press) in the SISMME website

Rossi, **Fecarotta**, Bembi, Di Rocco, Donati, Parenti Raccomandazioni per il trattamento e follow up di pazienti affetti da malattia di Pompe. Online publication (in press) in the SISMME website

Fecarotta S, Maggio E, Astarita L Agovino T, Giordano L, Ungano C, Minchini L, Parenti G, Simonelli F. *Un raro caso di glaucoma in un paziente con mucopolisaccaridosi tipo II*. IX Giornate “Giovani” di prospettive in Pediatria. 15-17 febbraio 2007

Fecarotta S, Romano A, Mansi G, Amitrano M, Astarita L, Bruschini D, Agovino T, Ungaro C, Paladino S, Parenti G, Andria G. *Riduzione della sintesi di substrato mediante terapia con miglustat nella malattia di Niemann-Pick tipo C (NPC)*. IX Giornate “Giovani” di prospettive in Pediatria. 15-17 febbraio 2007

S. Fecarotta, D. Melis, I. Scala e G. Andria. *La rete per le malattie rare: un modello di alleanza per la solidarietà*. Salute senza frontiere: formare medici nel mondo globalizzato. Marzo 2007

Astarita L, **Fecarotta S**, Sibilio M, Ungaro C, Mansi G, Iadecicco L, Servodio Iammarrone C, Soscia E, Andria G, Parenti G. *Terapia enzimatica sostitutiva nella mucopolisaccaridosi tipo II: valutazioni preliminari dell'efficacia in tre pazienti*. Accettato come poster al Congresso Medico Congiunto SIMGePed – SISMME – SISN. Malattie genetiche e metaboliche in pediatria: diagnosi, prevenzione e assistenza. Roma. 28 – 30 novembre 2007

Fecarotta S, Astarita L, Bruschini D, Ungaro C, Paladino S, Amitrano M, Perretti A, Mansi G, Romano A, Della Casa R, Parenti G, Andria G. *Valutazione preliminare dell'efficacia della terapia con miglustat in 4 pazienti con malattia di Niemann-pick tipo C*. Accettato come comunicazione orale al Congresso Medico Congiunto SIMGePed – SISMME – SISN. Malattie genetiche e metaboliche in pediatria: diagnosi, prevenzione e assistenza. Roma, 28 – 30 novembre 2007

Malattie Metaboliche

a cura di G. Andria

Novità nel campo delle malattie metaboliche ereditarie

G. PARENTI, D. MELIS, M. ROSSI, S. FECAROTTA

Dipartimento di Pediatria, Università "Federico II", Napoli

Riassunto

In questo articolo vengono discusse alcune delle più recenti acquisizioni nel campo delle malattie metaboliche ereditarie.

Abbiamo condotto una revisione della letteratura degli ultimi 3 anni, prestando particolare attenzione ad alcuni aspetti, quali l'identificazione di nuovi difetti metabolici, l'acquisizione di nuove conoscenze sulle basi molecolari, sulla fisiopatologia, sulla storia naturale di queste malattie, l'introduzione di nuove metodiche diagnostiche e terapeutiche.

Tra i nuovi gruppi di difetti metabolici identificati negli anni più recenti abbiamo riportato gli esempi dei difetti congeniti di glicosilazione e dei difetti della biosintesi del colesterolo. Questi gruppi di disordini metabolici, in particolare il secondo, sono peculiari per il loro fenotipo, poco usuale tra le malattie metaboliche ereditarie e caratterizzato generalmente da difetti dello sviluppo embrionario.

Il deficit multiplo di solfatasi è stato riportato come esempio di una malattia metabolica ereditaria le cui basi molecolari sono state identificate negli ultimi anni. In questo interessante modello di patologia un difetto nella modificazione post-traslazionale di una famiglia di proteine è alla base del contemporaneo deficit di diverse solfatasi. Gli studi condotti sul deficit multiplo di solfatasi rappresentano anche un esempio di come la migliore conoscenza delle basi molecolari di una malattia possa avere una ricaduta positiva sullo sviluppo di terapie innovative, in questo caso per le malattie da accumulo lisosomiale.

Sono, inoltre, riportati esempi di malattie metaboliche ereditarie di cui è stata recentemente approfondita la storia naturale. Per alcune di queste malattie è stata segnalata la comparsa di severe complicanze, tali da condizionare pesantemente la prognosi dei pazienti.

L'introduzione di nuove tecnologie ha consentito lo sviluppo di nuovo approcci diagnostici, quale la Tandem Mass Spectrometry (TMS), o lo sviluppo di programmi di screening estesi a sempre

più ampi gruppi di malattie metaboliche. La diagnosi sempre più tempestiva di malattie metaboliche ereditarie riveste sempre maggiore importanza in quanto negli anni più recenti si sono significativamente ampliate le possibilità di terapia di queste malattie. Nuovi approcci terapeutici sono divenuti disponibili: tra questi sono riportati nell'articolo quelli basati sulla terapia enzimatica sostitutiva, la riduzione dei substrati e la stimolazione dell'attività residua di enzimi grazie a molecole "chaperone". Lo sviluppo e l'ottimizzazione di queste nuove strategie terapeutiche sta avendo un notevole impatto sulla prognosi e sulla qualità di vita dei pazienti affetti da malattie metaboliche ereditarie.

Summary

In this article we discuss about the most recent achievements in the field of the Inborn Errors of Metabolism (IEM).

We have reviewed the literature of the last 3 years with a specific focus on the identification and characterization of novel IEM, on the new insights in the molecular bases, pathophysiology and natural history of known IEM, on the development of new diagnostic tools and of new therapeutic strategies for this group of disorders.

Examples of recently characterized IEM are congenital defects of glycosylation (CDG) and defects of cholesterol biosynthesis. This latter group of metabolic disorders is of peculiar interest, as they are associated with disorders of embryonic development that result in multiple malformations, skeletal involvement and mental retardation.

Multiple Sulfatase Deficiency is an example of an intriguing condition whose molecular bases have remained obscure for several decades. The recent identification of the molecular bases of this disease has brought to the attention of researchers the importance of defects of post-translational modifications in human disease; these studies are also im-

portant for the development of new therapies for lysosomal diseases.

A few studies have been recently published on the long-term follow-up of patients with IEM, leading to a better understanding of their natural history and pointing to the possible occurrence of debilitating complications in several IEM.

The use of new technologies, such as Tandem Mass Spectrometry (TMS), have recently emerged as powerful tools for the diagnosis of IEM and are significantly changing the diagnostic work-up of an increasing number of IEM. The feasibility of screening programs based on TMS and other innovative approaches is currently being evaluated.

Improved and earlier diagnosis of IEM is particularly important since new therapeutic approaches for many IEM have become available in the recent years, including enzyme replacement, substrate reduction and "chaperone" based enzyme enhancement therapies. The development of these therapeutic strategies represents one of the most interesting new achievements in the field of IEM and has a significant impact on the quality of life and prognosis of patients.

Introduzione

Come in molti altri campi della medicina, anche nel campo delle malattie metaboliche ereditarie gli anni più recenti sono stati ricchi di nuove acquisizioni. Questi progressi sono stati indubbiamente favoriti sia dalla sempre più approfondita conoscenza della fisiopatologia di questo gruppo di malattie, sia dalla disponibilità di nuove metodologie analitiche e tecnologie produttive, quali quelle messe a disposizione dagli avanzamenti nel campo della biologia molecolare. Le malattie metaboliche ereditarie sono un capitolo molto particolare

della pediatria: si tratta di patologie rare e tradizionalmente ostiche per chi non è un "addetto ai lavori". Per questo motivo è facile che anche il pediatra più attento non riesca a tenersi aggiornato sulle novità in questo specifico campo. Una revisione "guidata" della letteratura può essere perciò di aiuto per il pediatra che voglia selezionare le novità più significative sulle malattie metaboliche.

I motivi di interesse per il pediatra di questa revisione sono da trovare in primo luogo nel fatto che, nonostante le malattie metaboliche siano individualmente malattie rare, la loro frequenza globale è comunque significativa ed ogni pediatra può essere chiamato a interagire con pazienti o famiglie di pazienti con malattie metaboliche. A tale proposito va sottolineato che alcuni dei progressi più recenti (ad esempio le nuove metodiche diagnostiche, le nuove terapie, le più complete conoscenze sulla storia naturale delle malattie) hanno superato la fase sperimentale ed hanno avuto già una ricaduta diretta nella diagnosi e nella cura dei pazienti affetti dalle malattie metaboliche ereditarie. Inoltre, alcuni progressi ottenuti nel campo delle malattie metaboliche rappresentano un modello di interesse generale per la medicina e vanno perciò conosciuti indipendentemente dalla frequenza della patologia.

Nel preparare questa revisione della letteratura, abbiamo deciso di limitare la ricerca agli ultimi tre anni (2002-2005) ed abbiamo selezionato alcuni aspetti che potevano risultare di interesse per il pediatra generalista. Gli aspetti considerati sono i seguenti:

- l'identificazione di nuove malattie metaboliche prima sconosciute.
- L'interesse per questo aspetto de-

riva dal fatto che la scoperta di nuove malattie (o di nuovi gruppi di malattie) ha ulteriormente ampliato lo spettro fenotipico delle malattie metaboliche ereditarie e ci ha insegnato che alcuni quadri clinici, come ad esempio la presenza di malformazioni, possono essere il risultato di difetti metabolici;

- le nuove conoscenze sulle basi molecolari e la fisiopatologia delle malattie metaboliche. In questo caso le novità più interessanti si riferiscono alla scoperta di nuovi meccanismi responsabili di difetti enzimatici ed ai percorsi che hanno condotto alla scoperta di tali meccanismi;
- le conoscenze sulla storia naturale e sulla variabilità clinica delle malattie metaboliche. La sopravvivenza di pazienti con malattie metaboliche è migliorata negli ultimi decenni grazie alle nuove strategie terapeutiche. La conoscenza dell'evoluzione e della storia naturale delle malattie metaboliche è perciò una novità che stiamo osservando in questi anni "in diretta" e che può riservare sia piacevoli sorprese che delusioni;
- le nuove metodologie diagnostiche. La disponibilità di nuovi strumenti diagnostici ha aperto nuovi scenari nella diagnosi e nello screening di malattie metaboliche;
- i nuovi approcci terapeutici. Questo è probabilmente l'aspetto più importante, in quanto la cura delle malattie metaboliche e la migliore qualità di vita dei pazienti rappresentano la missione di chi si occupa di queste patologie. Il pediatra deve sapere che anche in questo caso gli scenari stanno rapidamente cambiando e che si stanno aprendo prospettive fino a pochi anni fa impensabili.

Strategia della ricerca

La strategia della ricerca bibliografica è stata guidata da alcune considerazioni preliminari.

Sotto la categoria di malattie metaboliche vengono inclusi difetti biochimici che hanno in comune solo il fatto di essere dovuti ad uno specifico deficit enzimatico con conseguente blocco di una via metabolica.

In realtà, quello delle malattie metaboliche è un campo vasto ed estremamente eterogeneo, proprio per le caratteristiche peculiari di queste malattie. Esse interessano, infatti, diverse vie metaboliche e diverse classi di metaboliti, diversi tessuti, cellule o compartimenti subcellulari, con conseguenze sul piano del fenotipo estremamente variabili.

Inoltre, trattandosi di malattie rare, se considerate singolarmente, è difficile che vengano condotti studi su casistiche ampie o che siano applicate a questo gruppo di disordini le metodologie statistiche utilizzate per patologie frequenti.

I lavori che più frequentemente si ritrovano in letteratura sono perciò generalmente report di piccoli gruppi di pazienti e studi dell'efficacia di terapie, più basati su un razionale e su limitate osservazioni cliniche, che su studi di casistiche o su metanalisi.

Alla luce di queste considerazioni si comprende facilmente come una ricerca tradizionale in Medline, inserendo stringhe quali "*inborn errors of metabolism*" e "*therapy*" o "*diagnosis*" o "*gene*" etc., finisce con l'essere assolutamente indefinita, con un numero elevatissimo ed eterogeneo di citazioni (nell'ordine di varie migliaia per ognuna delle singole ricerche). Limitando la ricerca ad alcune tipologie di studi, si può ridurre il numero di citazioni otte-

nute: ad esempio si ottengono alcune decine di review, 4 studi randomizzati controllati (RCT) e nessuna metanalisi o *practice guideline*.

La ricerca di linee guida nell'approccio ai pazienti metabolici è ugualmente difficile. In tal caso è possibile consultare il sito www.guidelines.gov utilizzando come parole chiave "inherited metabolic disease" o "inborn errors of metabolism": in questo modo si ottengono poche decine di *items*, di cui solo 5 in realtà riguardano linee guida *evidence based* su malattie metaboliche ereditarie (malattia di Fabry, fenilchetonuria, iperomocistinememia, linee guida generali di management e counselling di malattie metaboliche ereditarie).

La ricerca bibliografica è stata perciò effettuata partendo già dalle conoscenze del pediatra "addetto ai lavori" e quindi aggiornato su singoli argomenti in cui si sono osservate di recente le più significative novità. In questi ambiti più ristretti sono state effettuate ricerche bibliografiche in un certo senso "mirate".

Il campo della ricerca è stato perciò ristretto inserendo nella *query* di volta in volta i singoli gruppi di malattie metaboliche o specifiche malattie.

Alcune ricerche tra quelle che avevamo considerato di particolare interesse si sono rivelate ancora più problematiche. Ad esempio per la ricerca di malattie metaboliche identificate di recente, sono state consultate anche dati quali OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, www3.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM), una banca dati in cui sono elencate tutte le malattie che riconoscono una ereditarietà mendeliana (restringendo la ricerca ai capitoli la cui data di creazione è successiva al 2002), op-

pure la classificazione delle malattie metaboliche disponibile sul sito della SSIEM (Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, www.ssiem.org.uk); queste ricerche tuttavia sono state di scarso aiuto.

Identificazione di nuove malattie metaboliche

Nonostante più di un secolo di ricerca sulle malattie metaboliche (le prime di queste malattie furono identificate agli inizi del ventesimo secolo), ancora oggi vengono riconosciute nuove entità o addirittura nuovi gruppi di malattie prima sconosciute. Non è difficile immaginare che, con l'avvento di nuove metodologie diagnostiche, il futuro ci riservi ancora ulteriori interessanti novità. È utile che il pediatra sia al corrente di queste *new entries* nel panorama delle malattie metaboliche e soprattutto di come la scoperta di queste nuove malattie abbia dato indicazioni sull'esistenza e sulla fisiologia di specifiche vie metaboliche.

Un esempio è quello del gruppo dei difetti congeniti di glicosilazione, trattato in dettaglio da Strisciuglio et al. in un articolo su questo numero di Prospettive in Pediatria. Nonostante le reazioni di glicosilazione delle glicoproteine rappresentino un'importante e comune modificazione post-translazionale e, come ricordano Strisciuglio et al., circa l'1% del genoma umano codifichi per enzimi implicati in questi processi, l'identificazione del ruolo dei difetti di glicosilazione di glicoproteine in patologia umana è relativamente recente e risale all'inizio degli anni Novanta (Jaeken, 1991). Questo gruppo di disordini metabolici rappresenta un modello di come

una attenta osservazione clinica e una valutazione di dati biochimici di routine abbia aperto la strada alla scoperta di un intero capitolo delle malattie metaboliche, che con il tempo è divenuto sempre più ampio e complesso. Nella review di Strisciuglio et al. viene sottolineato, infatti, che lo spettro fenotipico dei difetti congeniti di glicosilazione continua tuttora ad ampliarsi, ed in parallelo aumentano le indicazioni cliniche alla ricerca di questi difetti. Nel web esiste il sito Euroglycan (www.euroglycan.org) in cui è riportata e periodicamente aggiornata la classificazione di questo gruppo di malattie.

La scoperta di un altro gruppo di disordini metabolici, i difetti della biosintesi del colesterolo, rappresenta un modello altrettanto interessante. In questo caso è stato riconosciuto un difetto biochimico in entità cliniche già da tempo conosciute, ma tradizionalmente considerate come entità su base patogenetica diversa.

L'esempio meglio caratterizzato è quello della sindrome di Smith-Lemli-Opitz. Questa sindrome plurimalformativa era nota già da quaranta anni, quando nel 1993 fu dimostrato un difetto dell'enzima che catalizza l'ultima tappa della biosintesi del colesterolo (la 7-deidrocolesterolo reductasi). Dopo l'identificazione delle basi biochimiche della sindrome di Smith-Lemli-Opitz (Irons, 1993; Jira, 2003) altri difetti della biosintesi del colesterolo sono stati riconosciuti, soprattutto dal 1998 ad oggi (Porter, 2003). Gli ultimi difetti di questo gruppo di malattie segnalati in letteratura sono la Latosterolosi nel 2002 (Brunetti-Pierri et al., 2002; Porter et al., 2003) e la displasia di Greenberg nel 2003 (Waterham et al., 2003) (Tab. I).

Tab. I. Difetti della biosintesi del colesterolo.

Malattia (OMIM)	Anno	Difetto Biochimico	Rit. mentale	Malformazioni cerebrali arti scheletro organi interni			
Mevalonico-acidemia (251170) S. Iper IgD (260920)	1986	MK	+	+			
S. Smith-Lemli-Opitz (270400)	1993	DHCR7	+	+	+	+	+
Desmosterolosi (602398)	1998	DHCR24	+	+	+	+	+
S. Conradi-Hunermann-Happle (302960)	1999	EBP			+	+	
S. CHILD (308050)	1999	NSDHL			+	+	
Latosterolosi (607330)	2002	SC5D	+		+	+	+
Displasia Greenberg/omozigosi anomalia Pelger-Huet (215140)	2003	LBR	+		+	+	+

MK: Mevalonato-chinasi; DHCR7: 7-deidrocolesterolo-reduttasi; DHCR24: 3- β -idrossisterolo- Δ 24-reduttasi; EBP: Δ 8- Δ 7-isomerasi; NSDHL: Sterolo-3- β -idrossi-steroido-deidrogenasi; SC5D: 3- β -idrossi-steroido-C5desaturasi; LBR: Sterolo- Δ 14-reduttasi.

Un aspetto che accomuna tutti i difetti della biosintesi del colesterolo è che essi si manifestano sul piano clinico come sindromi plurimalformative (malformazioni cranio-facciali, malformazioni strutturali del sistema nervoso centrale, difetti della linea mediana dalla labio-palatoschisi fino all'oloprosencefalia, malformazioni cardiache, gastrointestinali, polidattilia, sindattilia) o difetti dello sviluppo dello scheletro.

Sindromi caratterizzate da importanti malformazioni e ritardo mentale sono tradizionalmente considerate il risultato di patologie cromosomiche o di patologie in cui sono implicate mutazioni di geni dello sviluppo. Che un difetto di una singola tappa di una via biosintetica di una piccola molecola possa risultare in un difetto della morfogenesi è perciò una novità abbastanza sorprendente. Come ciò possa accadere è stato di recente chiarito da studi sul-

l'importanza del colesterolo nella funzione delle proteine hedgehog (come *Sonic hedgehog*). Queste proteine svolgono un ruolo essenziale nella trasduzione del segnale nelle prime fasi dello sviluppo embrionario, soprattutto nelle regioni da cui si svilupperanno gli organi che risultano più fortemente malformati nei difetti della biosintesi del colesterolo (prosencefalo, abbozzi degli arti etc.). Per essere correttamente processate ed attivate queste proteine hanno bisogno di legarsi covalentemente con un residuo di colesterolo (Cooper et al., 2003). È evidente che una alterazione del metabolismo del colesterolo possa interferire pesantemente con la loro funzione.

I difetti della biosintesi del colesterolo e la fisiopatologia delle malformazioni in queste malattie sono stati oggetto di numerose recenti review. Il pediatra che volesse ap-

profondire questo problema può facilmente consultarne qualcuna, anche in riviste di ambito pediatrico (Porter, 2003).

Nuove conoscenze sulle basi molecolari e la fisiopatologia delle malattie metaboliche

Una ricerca in Medline, inserendo "inborn error of metabolism" e "gene" risulta in circa 2.600 citazioni dal 2002 ad oggi, documentando l'enorme mole di ricerca scientifica sull'argomento. In questa massa di produzione scientifica abbiamo selezionato il recente riconoscimento delle basi molecolari e della fisiopatologia di una rara malattia lisosomiale, il deficit multiplo di solfatasi, le cui cause erano rimaste enigmatiche per vari decenni. In questo caso l'approccio tradizio-

nale che va dall'identificazione di metaboliti patologici, indicativi di un blocco di una via metabolica, alla dimostrazione di uno specifico difetto enzimatico, fino al riconoscimento delle basi molecolari (e quindi dei geni responsabili) delle malattie metaboliche, è stato particolarmente difficile e, forse proprio per questo, avvincente.

Nel deficit multiplo di solfatasi, si osserva la contemporanea carenza di tutte le solfatasi. Il fenotipo di questa malattia non è che la somma dei fenotipi dei singoli deficit enzimatici (ad esempio una grave compromissione neurologica ed alterazioni della mielina come quelle della leucodistrofia metacromatica da deficit di arilsolfatasi A; segni da accumulo viscerale e scheletrico come quelli osservati in alcune mucopolisaccaridosi da deficit di solfatasi; ittiosi cutanea come quella osservata nell'ittiosi *X-linked* da deficit di steroido solfatasi).

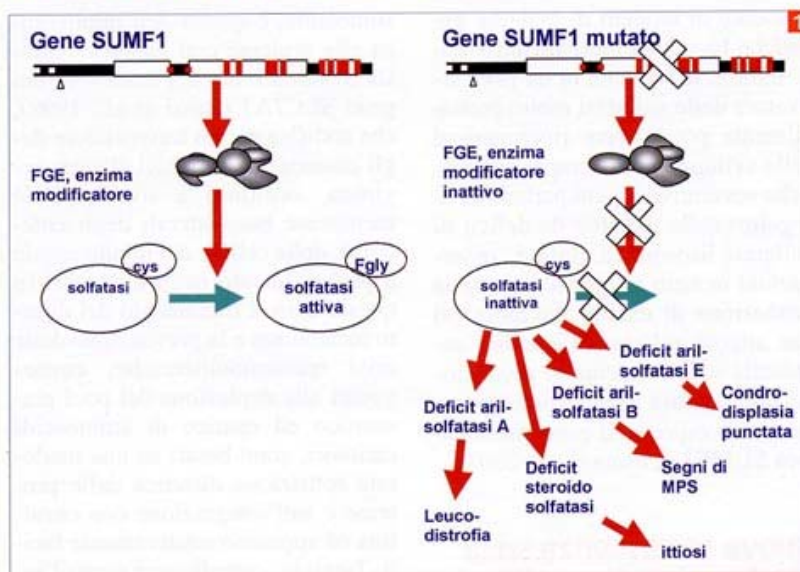
Il deficit contemporaneo di vari enzimi, codificati da geni diversi localizzati su cromosomi diversi, in una malattia ereditata come carattere mendeliano autosomico recessivo è sempre stato difficile da spiegare. I primi tentativi di trovare una spiegazione (ridotta stabilità degli enzimi, presenza di un inibitore), che datano dagli anni Ottanta, sono risultati infruttuosi e il deficit multiplo di solfatasi è rimasta l'unica malattia lisosomiale di cui non si conoscevano le basi molecolari fino a qualche anno fa.

La soluzione del problema si è avuta solo quando si è approfondita la conoscenza delle caratteristiche generali delle solfatasi. Studi iniziati a metà degli anni Novanta hanno chiarito che le solfatasi sono una famiglia di proteine dotate di attività

Fig. 1. Basi molecolari del deficit multiplo di solfatasi.

SUMF1 codifica per l'enzima modificatore delle solfatasi FGE (formylglycine generating enzyme). Questo enzima modificatore attiva le diverse solfatasi trasformando un residuo di cisteina localizzato nei siti attivi delle solfatasi in formilglicina. Nel deficit multiplo di solfatasi muta-

zioni del gene SUMF1 rendono inattivo l'enzima FGE e quindi le solfatasi non vengono attivate. Il deficit delle singole solfatasi è responsabile delle diverse manifestazioni cliniche della malattia. Nello schema sono riportati per esempio i deficit di 4 solfatasi. In realtà il quadro clinico è determinato dal deficit di almeno 12 solfatasi diverse.



enzimatica in grado di staccare un gruppo solfato da una vasta gamma di substrati solfati, che vanno da macromolecole (mucopolisaccaridi, solfatidi) a piccole molecole (steroidi). Sebbene abbiano una variabile localizzazione cellulare (lisosomi, reticolo endoplasmico, apparato di Golgi), esse hanno una elevata omologia di sequenza. In particolare, la sequenza è estremamente simile nella regione del sito attivo, laddove è costantemente presente un residuo di cisteina che ha un ruolo chiave nella reazione enzimatica di desolfatazione. Si è osservato, infatti, che, per essere attive, le solfatasi hanno bisogno della modificazione di questo residuo di cisteina presente nel sito attivo, ad opera di un enzima, che però è restato a lungo sconosciuto. È stato perciò ipotizzato che un deficit di questo enzima "modificatore" delle solfatasi fosse responsabile della malattia. Tuttavia, l'identificazione del gene che codifica per l'enzima "modifica-

tore" non è stato un compito facile. Solo nel 2003 due gruppi, di cui uno italiano, con approcci diversi (uno basato sulla purificazione dell'enzima "modificatore", l'altro su un approccio di clonaggio posizionale, cioè sull'identificazione della regione cromosomica dove è localizzato il gene-malattia) hanno dimostrato che il deficit delle diverse solfatasi è dovuto a mutazioni di un singolo gene, denominato SUMF1 (*sulfatase modifying factor 1*). Questo gene codifica per l'enzima che modifica il sito attivo di tutte le solfatasi, in particolare della cisteina, attivandole (Cosma et al., 2003; Dierks et al., 2003; Cosma et al., 2004) (Fig. 1).

Quello evidenziato nel corso delle ricerche sulle basi molecolari del deficit multiplo di solfatasi è perciò un nuovo esempio, finora mai osservato, di una modificazione post-traslazionale in grado di attivare le funzioni di specifiche classi di proteine. I risultati di questa ricerca aprono la strada al possibile ricono-

scimento di modelli di malattie genetiche basate su meccanismi simili. Inoltre, la scoperta di un gene attivatore delle solfatasi molto probabilmente potrà avere ripercussioni sullo sviluppo delle terapie enzimatiche sostitutive (di cui parleremo di seguito) nelle malattie da deficit di solfatasi lisosomiali. Infatti, osservazioni *in vitro* suggeriscono che la produzione di enzimi ricombinanti con attività solfatasi è molto aumentata se nel sistema di produzione dell'enzima viene contemporaneamente espresso il gene modificatore SUMF1 (Cosma et al., 2003).

Nuove conoscenze sulla storia naturale e sulla variabilità clinica delle malattie metaboliche

Il trattamento di molti errori congeniti del metabolismo ha drammaticamente cambiato la prognosi e la sopravvivenza dei pazienti affetti. Tuttavia, la maggiore sopravvivenza dei pazienti, con periodi di follow-up prolungati, ha lasciato emergere problemi inattesi e complicanze finora sconosciute, che in passato la precoce perdita del paziente verosimilmente non consentiva di osservare, e che rappresentano un nuovo *challenge* per il pediatra metabolista.

Di conseguenza, l'ottimismo e l'entusiasmo dei clinici è stato recentemente sostituito da una maggiore cautela circa la prognosi di molti disordini, persino quando i pazienti sono stati trattati secondo i migliori protocolli disponibili.

Gli esempi sono numerosi e non è possibile elencarli tutti in questa sede. Uno di questi, particolarmente

stimolante, è quella dell'intolleranza alle proteine con lisinuria. Questa malattia è dovuta a mutazioni del gene SLC7A7 (Bassi et al., 1999), che codifica per un trasportatore degli aminoacidi cationici (lisina, arginina, ornitina) a livello delle membrane baso-laterali degli enterociti, delle cellule del tubulo renale e probabilmente negli epatociti. In questo caso il trattamento del difetto metabolico e la prevenzione delle crisi iperammoniemiche, conseguenti alla deplezione del pool plasmatico ed epatico di aminoacidi cationici, sono basati su una moderata restrizione dietetica delle proteine e sull'integrazione con citrullina ed appaiono relativamente facili. Tuttavia, complicanze come l'insufficienza renale, la pancreatite o la proteinosi alveolare, apparentemente non correlate ad uno squilibrio metabolico, inficiano severamente la prognosi dei pazienti (Parenti et al., 1995). In particolare, la comparsa di proteinosi alveolare è la complicanza più temuta, in quanto frequentemente fatale (Parenti et al., 1995; Santamaria et al., 2004). Un recente lavoro riporta la recidiva della proteinosi alveolare in un paziente affetto da intolleranza alle proteine con lisinuria (Santamaria et al., 2004). Questa osservazione apre nuove problematiche relative alla patogenesi della proteinosi alveolare ed in generale delle complicanze nella malattia. La patogenesi di queste complicazioni, infatti, non è chiara, ma recenti studi sembrerebbero suggerire che i livelli di ossido nitrico, un mediatore chimico che deriva dall'arginina, possano giocare un ruolo di primo piano nella loro comparsa (Kamada et al., 2001; Cherla e Jaimes, 2004; Mannucci et al., 2005).

Esistono ancora altri esempi ben noti di complicanze delle malattie metaboliche che compaiono indipendentemente dalla qualità del trattamento dello squilibrio metabolico (Tab. II). Nella metilmalonica acidemia si osservano danno renale e coinvolgimento neurologico, che non rispondono né alla terapia tradizionale (dieta, carnitina e vitamina B12), né al trapianto epatico, di recente proposto come terapia di questa malattia (Nyhan et al., 2002; Chakrapani et al., 2002).

I pazienti affetti da galattosemia, nonostante siano trattati con una dieta priva di galattosio possono presentare cataratta, ritardo mentale, ritardo del linguaggio ed insufficienza ovarica prematura (Leslie, 2003).

La glicogenosi tipo 1, in passato considerata una malattia a prevalente coinvolgimento epatico, viene oggi riconosciuta come un disordine multisistemico: adenomi epatici, coinvolgimento renale fino all'insufficienza renale, bassa statura associata a ritardo puberale, policistosi ovarica sono frequenti complicazioni (Rake et al., 2002-a; Rake et al., 2002-b).

Inoltre, recentemente è stato dimostrato un coinvolgimento del sistema nervoso centrale che risulterebbe associato alla presenza di episodi ricorrenti di ipoglicemia apparentemente asintomatici (Melis et al., 2004).

Le manifestazioni multisistemiche sono ancora più serie nella glicogenosi 1b, in cui si osservano neutropenia ed insufficienza funzionale dei neutrofili, la cui patogenesi rimane ancora oscura. La neutropenia è verosimilmente responsabile di infezioni recidivanti e di un aumentato rischio di malattia infiammatoria cronica intestinale (Visser et al., 2000; Melis et al., 2003).

Tab. II. Alcuni esempi di complicanze di malattie metaboliche non legate allo squilibrio metabolico acuto o al difetto biochimico di base.

MALATTIA	COMPLICANZE
Intolleranza alle proteine con lisinuria	Insufficienza renale, pancreatite, proteinosi alveolare, piastrinopenia, sindrome emofagocitica
Tirosinemia tipo I	Nefropatia, neuropatia, rachitismo, cardiomiopatia ipertrofica, sintomi psichiatrici, insufficienza respiratoria, carcinoma epatocellulare
Metilmalonicoacidemia	Nefropatia tubulo-interstiziale e IRC, coinvolgimento neurologico, sintomi psichiatrici
Propionicoacidemia	Cardiomiopatia dilatativa, RSPM, sintomi neurologici, sintomi psichiatrici
Difetti della beta-ossidazione degli acidi grassi	SIDS, insufficienza renale acuta con mioglobinuria, insufficienza surrenalica, ipoparatiroidismo
Difetti della catena respiratoria	Diabete, deficit di GH, complicanze renali, ipoparatiroidismo, insufficienza surrenalica
Galattosemia	Cataratta, ritardo mentale, ritardo del linguaggio, insufficienza ovarica prematura
Glicogenosi tipo I	Adenomi epatici, insufficienza renale, bassa statura e ritardo puberale, policistosi ovarica, neutropenia e malattia infiammatoria cronica intestinale (tipo Ib)

Nuove metodologie diagnostiche

La disponibilità di strumenti diagnostici innovativi ha avuto un significativo impatto sull'assistenza a pazienti con malattie metaboliche. Un esempio significativo è quello della *tandem mass spectrometry*. Questa metodica consente l'identificazione di metaboliti anomali nella diagnostica di una serie di difetti metabolici (aminoacidopatie, acidemia organiche, malattie del metabolismo mitocondriale). L'introduzione di questa metodologia risale già a circa un decennio fa, ma ora se ne stanno valutando appieno le possibilità e l'applicabilità a programmi di screening. Una review recente è rivolta al pediatra sui recenti sviluppi e sulle applicazioni di tale metodica è quella di Rinaldo et

al., apparsa su *Current Opinion in Pediatrics* nel 2004.

Sempre nell'ambito delle nuove prospettive di screening per malattie per le quali finora tale possibilità non era praticabile, come le malattie da accumulo lisosomiale, sono da segnalare gli studi di un gruppo australiano. L'approccio utilizzato in programmi sperimentali di screening neonatale per le malattie lisosomiali è basato sul dosaggio di glicosfingolipidi e oligosaccaridi in spot di sangue su cartoncino. Le potenzialità di questo approccio, soprattutto alla luce delle nuove opzioni terapeutiche per queste malattie, sono state valutate in un recente studio retrospettivo (Meikle et al., 2004) e sono discusse in una recente review rivolta ai pediatri (Meikle e Hopwood, 2003).

Nuovi approcci terapeutici

L'aspetto che ha avuto il maggiore impatto sulla qualità di vita dei pazienti affetti da malattie metaboliche è la messa a punto di nuove strategie terapeutiche.

La messa a punto delle prime strategie terapeutiche per correggere i difetti metabolici di questi pazienti risale a più di cinquanta anni fa, con l'introduzione della terapia dietetica per la fenilchetonuria e tradizionalmente l'approccio basato sulla restrizione dietetica dei precursori della via metabolica alterata è quello più largamente impiegato.

Tuttavia, soprattutto nel corso degli anni più recenti, le strategie utilizzate per la terapia delle malattie metaboliche si sono diversificate (Tab.

Tab. III. Principi generali di terapia delle malattie metaboliche.

Principi generali	Esempi approcci	Esempi malattia	
Riduzione dell'accumulo di metaboliti dannosi	Dieta	PKU, leucinosi, difetti del ciclo dell'urea, accidente organiche	Vengono utilizzate diete speciali con ridotto apporto di metaboliti tossici (per es. fenilalanina nella PKU) o loro precursori
Supplementazione di metaboliti carenti	Dieta	Glicogenosi, SLOS	Viene utilizzata una dieta che fornisca il metabolita la cui produzione è deficitaria (per es. dieta a pasti frazionati con frequente apporto di glucosio disponibile nelle glicogenosi epatiche)
Detossificazione di metaboliti dannosi	Dialisi	Leucinosi, difetti del ciclo dell'urea, acidemie organiche	Rimozione di metaboliti tossici che si sono accumulati in fase acuta di scompenso (ammonio, leucina, acidi organici)
Stimolazione di vie metaboliche alternative	Sodio fenilbutirrato sodio benzoato	difetti del ciclo dell'urea	Uso di farmaci che attivano vie di detossificazione alternative (per es. il sodio-fenilbutirrato permette la detossificazione dell'ammonio legando la glutamina)
Supplementazione di cofattori	BH4, B12	PKU, acidemie organiche	Stimolano l'attività enzimatica residua
Inibizione della produzione di metaboliti tossici	NTBC	tirosinemia	Tale approccio crea un blocco metabolico farmacologico, a monte del deficit enzimatico tipico della malattia, che evita la produzione di metaboliti dannosi
Aumento della disponibilità di enzima	ERT	Malattie lisosomiali	Aumento dei livelli di enzima disponibile, somministrando dall'esterno l'enzima carente.
	Trapianto	Malattie lisosomiali Difetti del ciclo dell'urea Glicogenosi Organico-acidemie	Aumento dei livelli di enzima disponibile, che viene sintetizzato nell'organo trapiantato (midollo o fegato)
Deprivazione di substrato	Imino-zuccheri	Malattie lisosomiali	Blocco della sintesi del composto che si accumula
Aumento dell'attività enzimatica residua	Chaperones (galattosio imino-zuccheri)	Malattie lisosomiali (Fabry)	Stabilizzazione dell'enzima mutato, con stimolazione dell'attività residua

III). Sono stati introdotti farmaci in grado di attivare vie metaboliche alternative, al fine di smaltire i metaboliti potenzialmente tossici (come la terapia con sodio fenilbutirrato e sodio benzoato nel caso dei difetti

del ciclo dell'urea), farmaci in grado di bloccare la via metabolica a monte del blocco geneticamente determinato, in modo da impedire la formazione di metaboliti tossici (come nel caso dell'NTBC per la tiro-

sinemia acuta). Sono stati utilizzati approcci basati su trapianti di fegato o di midollo.

Le più recenti strategie introdotte nell'armamentario terapeutico (e che possono essere definite veri *breakth-*

rough) per le malattie metaboliche sono la terapia enzimatica sostitutiva e la riduzione del substrato. Entrambi questi approcci sono stati utilizzati per trattare malattie da accumulo lisosomiale. Per queste patologie metaboliche fino a pochi anni fa il compito del pediatra metabolista era tra i più frustranti, essendo disponibili solo terapie di supporto.

Il razionale della terapia enzimatica sostitutiva è totalmente diverso da quello di altri approcci fino ad allora utilizzati nella terapia delle malattie metaboliche. Piuttosto che ad una riduzione dei metaboliti dannosi, la terapia enzimatica sostitutiva è orientata all'aumento dei livelli di enzima disponibile, somministrando dall'esterno l'enzima carente. Per le malattie da accumulo lisosomiale questo approccio trova le migliori indicazioni. Infatti, gli enzimi lisosomiali esogeni possono essere internalizzati dalle cellule dell'organismo, grazie ad un sofisticato sistema di marcatori (il mannosio 6-fosfato ed il mannosio) e recettori specifici.

L'interesse destato nel mondo scientifico da questo approccio è testimoniato dal fatto che una ricerca Medline con le parole chiave *lysosomal storage disease* e *therapy*, limitata agli ultimi 3 anni, evidenzia 640 citazioni, di cui quasi la metà (253) riguarda la terapia enzimatica sostitutiva.

Circa quindici anni fa sono stati registrati i primi successi della terapia enzimatica sostitutiva (utilizzando enzima estratto da placente somministrato ogni due settimane per infusione endovenosa) nel trattamento della malattia di Gaucher (Barton et al., 1991). Proprio per questa malattia è stata raccolta e pubblicata la maggiore esperienza clinica. La malattia di Gaucher rappresenta probabilmente una delle poche eccezioni, rispetto al

panorama generale delle malattie metaboliche, visto che in questo caso è stato possibile condurre studi e raccogliere dati su un numero considerevole di pazienti. Nella letteratura scientifica degli ultimi anni, infatti, è riportata l'analisi dei risultati del trattamento di oltre 3.000 pazienti di tutto il mondo (Weinreb et al., 2002). Al pediatra segnaliamo inoltre che, nonostante l'esperienza nella terapia enzimatica sostitutiva per la malattia di Gaucher sia più che decennale, soltanto recentemente sono state pubblicate le raccomandazioni emerse dal consenso di una commissione di esperti della comunità scientifica internazionale per il trattamento, la valutazione e il monitoraggio (Andersson et al., 2005; Weinreb et al., 2004; Charrow et al., 2004; Baldellou et al., 2004; Grabowski et al., 2004) di pazienti adulti e pediatrici; infine recentissima è la definizione dei *goals* terapeutici (Pastores et al., 2004) necessari alla valutazione dell'efficacia della terapia nel singolo paziente.

Alla luce dei buoni risultati nella terapia della malattia di Gaucher e grazie a metodiche di biologia molecolare che hanno consentito una produzione su larga scala di enzimi umani ricombinanti, negli ultimi anni si è verificata una esplosione delle esperienze basate su questo approccio, esteso alla malattia di Fabry (Beck et al., 2004; Wilcox et al., 2004), alla malattia di Pompe (Amalfitano, 2001; Kishnani e Howell, 2004; Van den Hout et al., 2001; Van den Hout et al., 2004), alla mucopolisaccaridosi I (Kakkis et al., 2001; Wraith et al., 2004), alla mucopolisaccaridosi VI (Harmatz et al., 2004), mentre sono in corso trial sperimentali per la mucopolisaccaridosi II e per la malattia di Niemann-Pick tipo B.

Al pediatra che vuole aggiornarsi sull'argomento consigliamo il lavoro più recente sull'efficacia della terapia enzimatica sostitutiva nella mucopolisaccaridosi I (Wraith et al., 2004), uno dei pochi studi statistici controllati che si osservano nel campo delle malattie metaboliche. In questo studio vengono descritti i buoni risultati ottenuti con la terapia enzimatica sostitutiva in 45 pazienti in termini di riduzione dell'escrezione di glicosaminoglicani, riduzione delle dimensioni di fegato e milza, riduzione dell'ostruzione respiratoria alta, miglioramento della motilità articolare.

Un analogo studio è stato pubblicato per la mucopolisaccaridosi VI sullo stesso numero di *Journal of Pediatrics* (Harmatz et al., 2004).

Può essere anche consigliabile consultare alcune delle numerose review (Desnick, 2004; Brady e Schiffmann, 2004), che illustrano lo stato dell'arte sull'argomento, insieme alle problematiche che ancora restano da affrontare, come la impossibilità dell'enzima ricombinante a superare la barriera emato-encefalica e a correggere, quando presente, la sintomatologia neurologica.

Ancora più di recente è stato sviluppato l'approccio basato sulla riduzione del substrato. Il razionale di questo tipo di terapia è ancora diverso, e quindi innovativo, e rappresenta una vera e propria manipolazione biochimica della via metabolica alterata. Alcuni composti chimici, in generale iminozuccheri, sono in grado di inibire la sintesi, e pertanto l'accumulo, delle macromolecole che si accumulano nelle malattie lisosomiali. I primi studi anche in questo caso sono stati condotti nella malattia di Gaucher (Cox et al., 2000; Elstein et al., 2004). In letteratura sono comparse di recente review sull'argo-

mento (Cox et al., 2003; Pastores et al., 2003; Platt et al., 2001). Ancora più recentemente è stata studiata la possibilità di utilizzare chaperones chimici in grado di incrementare l'attività residua, ove presente, degli enzimi carenti nelle diverse malattie metaboliche. Il razionale di questo tipo di approccio è basato sul fatto che alcuni composti chimici, in generale con una struttura simile a quella dei substrati dei diversi en-

zimi, sono in grado di favorire la corretta struttura terziaria (*folding*) delle proteine enzimatiche e la loro stabilità. L'uso di chaperones chimici è ancora largamente sperimentale, ma ha trovato applicazione clinica in due casi, la malattia di Fabry con l'uso del galattosio (Frustaci et al., 2001; Asano et al., 2000), e la fenilchetonuria con l'impiego della tetraidrobiopterina (BH4), il cofattore della fenilalanina idrossilasi,

l'enzima carente nella fenilchetonuria. Vari studi promossi, soprattutto da gruppi svizzeri, hanno dimostrato l'efficacia della terapia con BH4 in forme di fenilchetonuria in cui erano presenti mutazioni del gene della fenilalanina idrossilasi che consentivano la presenza di una certa attività residua. Questo aspetto sarà trattato in dettaglio da Cerone in un capitolo di questo numero di Prospettive in Pediatria.

Box riassuntivo

Identificazione di nuove malattie metaboliche

La scoperta di nuove malattie dimostra che alcuni quadri clinici, come ad esempio la presenza di dimorfismi e/o malformazioni, possono essere il risultato di difetti metabolici (es. difetti della biosintesi del colesterolo, difetti di glicosilazione).

Nuove conoscenze sulle basi molecolari e fisiopatologia delle malattie metaboliche ereditarie (MME)

La caratterizzazione biochimica e molecolare di alcune patologie note, come il deficit multiplo di solfatasi, ha permesso l'identificazione di nuovi *pathways* biochimici ed una migliore comprensione di meccanismi fisiopatogenetici.

Storia naturale e variabilità clinica delle MME

Studi clinici di follow-up a lungo termine hanno permesso di chiarire la storia naturale ed hanno evidenziato problemi inattesi e complicanze finora sconosciuti, spesso indipendenti dalla presenza e dal trattamento di squilibri metabolici acuti.

Nuove metodologie diagnostiche

Nuovi strumenti diagnostici tra cui la *Tandem Mass Spectrometry*, hanno permesso lo screening e la diagnosi precoce di numerose MME, con la possibilità di notevoli progressi nell'assistenza clinica.

Nuovi approcci terapeutici

Terapia enzimatica sostitutiva, riduzione della sintesi dei substrati e induzione dell'attività enzimatica sono esempi di nuove recenti strategie terapeutiche in malattie per le quali in passato non esisteva possibilità di trattamento.

Bibliografia

Amalfitano A, Bengur AR, Morse RP, et al. *Recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: results of a phase I/II clinical trial*. Genet Med 2001;3:132-8.

Andersson HC, Charrow J, Kaplan P, et al. (International Collaborative Gaucher Group U.S. Regional Coordinators). *Individualization of long-term enzyme replacement therapy for Gaucher disease*. Genet Med 2005;7:105-10.

Asano N, Ishii S, Kizu H, et al. *In vitro inhibition and intracellular enhancement of lysosomal*

alpha-galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts by 1-deoxygalactonojirimycin and its derivatives. Eur J Biochem 2000;267:4179-86.

Baldellou A, Andria G, Campbell PE, et al. *Pediatric non-neuronopathic Gaucher disease: recommendations for treatment and monitoring*. Eur J Pediatr 2004;163:67-75.

- Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, et al. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency – macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1991;324:1464-70.
- Beck M, Ricci R, Widmer U, et al. Fabry disease: overall effects of agalsidase alfa treatment. *Eur J Clin Invest* 2004;34:838-44.
- Brady RO, Schiffmann R. Enzyme-replacement therapy for metabolic storage disorders. *Lancet Neurol* 2004;3:752-6.
- Brunetti-Pierri N, Corso G, Rossi M, et al. Lathosterolosis, a novel multiple-malformation/mental retardation syndrome due to deficiency of 3beta-hydroxysteroid-delta5-desaturase. *Am J Hum Genet* 2002;71:952-8.
- *Primo articolo sulla Lathosterolosi, focalizzato essenzialmente sulla caratterizzazione biochimica e molecolare di tale patologia.
- Chakrapani A, Sivakumar P, McKiernan PJ, Leonard JV. Metabolic stroke in methylmalonic acidemia five years after liver transplantation. *J Pediatr* 2002;140:261-3.
- Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, et al. Enzyme replacement therapy and monitoring for children with type I Gaucher disease: consensus recommendations. *J Pediatr* 2004;144:112-20.
- Cherla G, Jaimes EA. Role of L-arginine in the pathogenesis and treatment of renal disease. *J Nutr* 2004;134(Suppl 10):2801S-2806S.
- Cooper MK, Wassif CA, Krakowiak PA, et al. A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat Genet* 2003;33:508-13.
- Cosma MP, Pepe S, Annunziata I, et al. The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases. *Cell* 2003;113:445-56.
- Cosma MP, Pepe S, Parenti G, et al. Molecular and functional analysis of SUMF1 mutations in multiple sulfatase deficiency. *Hum Mutat* 2004;23:576-81.
- *Articolo sulla caratterizzazione delle basi molecolari del deficit multiplo di solfatasi.
- Cox T, Lachmann R, Hollak C, et al. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* 2000;355:1481-5.
- Cox TM, Aerts JM, Andria G, et al. The role of the iminosugar N-butyldeoxynojirimycin (miglustat) in the management of type I (non-neuronopathic) Gaucher disease: a position statement. *J Inherit Metab Dis* 2003;26:513-26.
- Desnick RJ. Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *J Inherit Metab Dis* 2004;27:385-410.
- Dierks T, Schmidt B, Borissenko LV, et al. Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme. *Cell* 2003;113:435-44.
- Elstein D, Hollak C, Aerts JM, et al. Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, N-butyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 2004;27:757-66.
- Frustaci A, Chimenti C, Ricci R, et al. Improvement in cardiac function in the cardiac variant of Fabry's disease with galactose-infusion therapy. *N Engl J Med* 2001;345:25-32.
- Grabowski GA, Andria G, Baldellou A, et al. Pediatric non-euronopathic Gaucher disease: presentation, diagnosis and assessment. Consensus statements. *Eur J Pediatr* 2004;163:58-66.
- Harmatz P, Whitley CB, Waber L, et al. Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *J Pediatr* 2004;144:574-80.
- Irons M, Elias ER, Salen G, et al. Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Lancet* 1993;341:1414.
- *Caratterizzazione biochimica della sindrome di Smith-Lemli-Opitz.
- Jaeken J, Stibler H, Hagberg B. The carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. A new inherited multisystemic disease with severe nervous system involvement. *Acta Paediatr Scand* 1991;375(Suppl):1-71.
- Jira PE, Waterham HR, Wanders RJ, et al. Smith-Lemli-Opitz syndrome and the DHCR7 gene. *Ann Hum Genet* 2003;67:269-80.
- *Review esauriente sulla sindrome di Smith-Lemli-Opitz.
- Kamada Y, Nagaretani H, Tamura S, et al. Vascular endothelial dysfunction resulting from L-arginine deficiency in a patient with lysinuric protein intolerance. *J Clin Invest* 2001;108:717-24.
- Kishnani PS, Howell RR. Pompe disease in infants and children. *J Pediatr* 2004;144(Suppl 5):S35-43.
- *Review esauriente sulla malattia di Pompe.
- Leslie ND. Insights into the pathogenesis of galactosemia. *Annu Rev Nutr* 2003;23:59-80.
- Mannucci L, Emma F, Markert M, et al. Increased NO production in lysinuric protein intolerance. *J Inherit Metab Dis* 2005;28:123-9.
- Meikle PJ, Hopwood JJ. Lysosomal storage disorders: emerging therapeutic options require early diagnosis. *Eur J Pediatr* 2003;162(Suppl 1):S34-7.
- Meikle PJ, Ranieri E, Simonsen H, et al. Newborn screening for lysosomal storage disorders: clinical evaluation of a two-tier strategy. *Pediatrics* 2004;114:909-16.
- Melis D, Parenti G, Della Casa R, et al. Crohn's like ileo-colitis in patients affected by glycogen storage disease Ib: two years follow-up of patients with a wide spectrum of gastrointestinal signs. *Acta Paediatr* 2003;92:1415-21.
- Melis D, Parenti G, Della Casa R, et al. Brain damage in glycogen storage disease type I. *J Pediatr* 2004;144:637-42.
- Nyhan WL, Gargus JJ, Boyle K, et al. Progressive neurologic disability in methylmalonic acidemia despite transplantation of the liver. *Eur J Pediatr* 2002;161:377-9.
- Parenti G, Sebastiao G, Strisciuglio P, et al. Lysinuric protein intolerance characterized by bone marrow abnormalities and severe clinical course. *J Pediatr* 1995;126:246-51.
- Pastores GM, Barnett NL. Substrate reduction therapy: miglustat as a remedy for symptomatic patients with Gaucher disease type I. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12:273-81.
- Pastores GM, Weinreb NJ, Aerts H, et al. Therapeutic goals in the treatment of Gaucher disease. *Semin Hematol* 2004;41(Suppl 5):4-14.
- Platt FM, Jeyakumar M, Andersson U, et al. Inhibition of substrate synthesis as a strategy for glycolipid lysosomal storage disease therapy. *J Inherit Metab Dis* 2001;24:275-90.
- Porter FD. Human malformation syndromes due to inborn errors of cholesterol synthesis. *Curr Opin Pediatr* 2003;15:607-13.
- *Review esauriente sui difetti della biosintesi del colesterolo.
- Rake JP, Visser G, Labrune P, et al. Glycogen storage disease type I: diagnosis, management, clinical course and outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease type I (ESGSDI). *Eur J Pediatr* 2002;161:S20-S34.
- Rake JP, Visser G, Labrune P, et al. Guidelines for management of glycogen storage disease type I-European Study on Glycogen Storage Disease type I (ESGSDI). *Eur J Pediatr* 2002;161:S112-S119.
- Rinaldo P, Tortorelli S, Matern D. Recent developments and new applications of tandem mass spectrometry in newborn screening. *Curr Opin Pediatr* 2004;16:427-33.
- *Review aggiornata sulle applicazioni della Tandem mass nelle malattie metaboliche pediatriche.
- Santamaria F, Brancaccio G, Parenti G, et al. Recurrent fatal pulmonary alveolar proteinosis after heart-lung transplantation in a child with lysinuric protein intolerance. *J Pediatr* 2004;145:268-72.
- Van den Hout JM, Reuser AJ, de Klerk JB, et al. Enzyme therapy for Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk. *J Inherit Metab Dis* 2001;24:266-74.
- Van den Hout JM, Kamphoven JH, Winkel LP, et

al. Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from milk. *Pediatrics* 2004;113:e448-57.

* Esempio di studio di follow-up a lungo termine di pazienti affetti da forma ad esordio infantile di malattia di Pompe in terapia enzimatica sostitutiva.

Visser G, Rake JP, Fernandes J, et al. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib: results of the European Study on Glycogen Storage Disease type I. *J Pediatr* 2000;137:187-91.

Weinreb NJ, Charrow J, Andersson HC, et al. Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. *Am J Med* 2002;113:112-9.

Weinreb NJ, Aggio MC, Andersson HC, et al. (International Collaborative Gaucher Group (ICGG). Gaucher disease type 1: revised recommendations on evaluations and monitoring for adult patients. *Semin Hematol* 2004;41(Suppl 5):15-22.

Waterham HR, Koster J, Mooyer P, et al. Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *Am J Hum Genet* 2003;72:1013-7.

* Caratterizzazione biochimica e molecolare della displasia di Greenberg.

Wilcox WR, Banikazemi M, Guffon N, et al. Long-term safety and efficacy of enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Am J Hum Genet*. 2004;75:65-74.

Winkel LP, Van den Hout JM, Kamphoven JH, et al. Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe's disease: a three-year follow-up. *Ann Neurol*. 2004;55:495-502.

* Esempio di studio di follow-up a lungo termine di pazienti affetti da forma ad esordio tardivo di malattia di Pompe in terapia enzimatica sostitutiva.

Wraith JE, Clarke LA, Beck M, et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *J Pediatr* 2004;144:581-8.

* primo studi statistico controllato su un numero elevato di pazienti affetti da mucopolisaccaridosi di tipo 1.

Corrispondenza

prof. Giancarlo Parenti
Dipartimento di Pediatria
Università Federico II
Via S. Pansini, 5
80131 Napoli
E-mail: parenti@unina.it

Working group: Fecarotta, Rossi, Cotugno, Gabrielli, Rovelli, Scarpa

RACCOMANDAZIONI PER LA MUCOPOLISACCARIDOSI DI TIPO I (M. DI HURLER-SCHEIE)

BACKGROUND

La mucopolisaccaridosi tipo I (MPS I) è una malattia autosomica recessiva dovuta al deficit dell'attività dell'enzima lisosomiale α -L- iduronidasi (IDUA). Ciò determina progressivo accumulo lisosomiale dei glicosaminoglicani (GAG) dermatan- ed eparan-solfato cui consegue il danno cellulare e la disfunzione multiorgano.

Le seguenti linee guida per la MPS I, sono conformi a quelle già redatte dall'MPS International Panel composto, tra gli altri, da pediatri, ortopedici e genetisti e hanno lo scopo di fornire indicazioni utili per la gestione multidisciplinare, il trattamento e il follow up dei pazienti. Ove possibile, lo scopo del trattamento è quello di un intervento mirato e precoce per migliorare la qualità di vita dei pazienti e dei loro familiari.

CLASSIFICAZIONE

Storicamente la MPS I è stata suddivisa in 3 diverse forme cliniche a decrescente gravità: la sindrome di Hurler (forma severa) con sopravvivenza < 10 anni, la sindrome di Hurler-Scheie (forma intermedia) con sopravvivenza <25 anni e la sindrome di Scheie (forma attenuata) con una durata di vita normale ma comunque associata a gravi disabilità). Oggi invece appare appropriato considerare la MPS I una malattia eterogenea con un ampio spettro di espressione fenotipica, che va dalla forma grave (sindrome di Hurler) a quella più attenuata (sindrome di Scheie), indistinguibili dal punto di vista biochimico (McGovern MM, 1998; Neufeld e Muenzer, 2001).

INCIDENZA

La MPS I è una patologia panetnica con una incidenza, nella popolazione italiana, di circa 1: 80.000 nati vivi, ugualmente distribuita tra i due sessi. (Dionisi Vici 2002)

Essa varia da 1:76000 per la MPS I /H a 1:280000 per il fenotipo Scheie. (Nelson. Hum Genet 1997; 101: 355-58).

BASI GENETICHE E BIOCHIMICHE

Il gene che codifica l' α -L- iduronidasi è costituito da 14 esoni ed è localizzato sul cromosoma 14p 16.3 (Scott et al, 1992; Scott et al 1993). Sono state identificate circa 100 mutazioni che comprendono mutazioni non-senso, missenso, alterazioni dello splicing, delezioni ed inserzioni.

L'analisi molecolare di trenta pazienti affetti da MPS I ha rilevato una grande eterogenicità genetica nel nostro Paese ed ha suggerito una possibile origine mediterranea delle mutazioni P353R e G51D (Venturi et al, 2002).

L'elevato numero di mutazioni nella MPS I non ha permesso in molti pazienti di stabilire una chiara correlazione genotipo/fenotipo. Allo stato attuale delle conoscenze ha sicuramente valore predittivo per il fenotipo severo la presenza di mutazioni non-senso, di cui Q70X e W 402X sono le più comuni nella popolazione caucasica, su entrambe gli alleli del gene IDUA (Terlato e Cox, 2003).

La presenza di mutazioni è responsabile di una ridotta attività dell'enzima IDUA che può variare dalla completa assenza nella forma più severa alla presenza di un'attività residua del 0.3% rispetto ai controlli nei pazienti con la forma più attenuata. L'attività enzimatica residua non può comunque essere utilizzata per predire il fenotipo patologico né la progressione della malattia, in quanto non rilevabile precisamente con le attuali tecniche diagnostiche.

MANIFESTAZIONI CLINICHE E FOLLOW UP

FORMA SEVERA

I pazienti con la forma severa di MPS I a causa di gravi scompensi cardiorespiratori e del progressivo coinvolgimento neurologico vanno incontro ad exitus generalmente entro la prima decade di vita.

Alte e basse vie aeree

Dal punto di vista respiratorio i sintomi a carico delle prime vie aeree sono caratterizzati da riniti, otiti e tracheiti recidivanti. I pazienti presentano frequentemente ipoacusia mista, spesso correlata con la gravità del quadro clinico. Le cause più importanti di ipoacusia includono le frequenti otiti, la presenza di otite catarrale cronica, la disostosi degli ossicini dell'orecchio interno, la presenza di cicatrici della membrana timpanica e un danno del nervo acustico. Inoltre l'ipertrofia adenotonsillare, associata all'ingrossamento della lingua, alla frequente presenza di stenosi della trachea dovuti al deposito di mucopolisaccaridi, sono responsabili di difficoltà respiratorie ingravescenti che si manifestano principalmente con roncopia e apnee notturne.

Ne consegue che tutti i paziente affetti da MPS I dovrebbero essere sottoposti a controlli ORL annuali per la diagnosi precoce di ipertrofia adenotonsillare, versamento endotimpanico e ipoacusia

e quindi la programmazione tempestiva degli eventuali interventi necessari come l'adenotonsilectomia il drenaggio trasntimpanico e l'eventuale prescrizione di protesi acustiche.

In caso di gravi ostruzioni a carico delle alte vie aeree (orofaringe o trachea), possono essere necessari interventi più o meno invasivi partendo dalla ventilazione assistita con pressioni positive (CPAP e BiPAP) fino ad arrivare alla necessità di eseguire tracheotomie.

Per quanto riguarda le basse vie aeree l'alterata conformazione della cassa toracica e la rigidità delle articolazioni costali possono determinare insufficienza respiratoria restrittiva, da monitorare quando possibile con le prove di funzionalità respiratoria. Tutti i pazienti pertanto dovrebbero essere seguiti routinariamente da un consulente pneumologo.

Sistema cardiovascolare

Dal punto di vista cardiaco può essere presente una cardiopatia valvolare, principalmente a carico delle valvole mitrale e aortica, con iniziale insufficienza e successiva stenosi che, con il progredire della malattia, possono determinare un'insufficienza cardiaca. Inoltre il deposito di GAGs a livello delle coronarie può determinare stenosi e di conseguente ischemia cardiaca (Wraith JE, 1995).

E' opportuno quindi eseguire controlli ecocardiografici ed ECG periodici. Da prendere in considerazione insieme al cardiologo l'opportunità di intervento valvolare.

Prima di ogni atto chirurgico è appropriato eseguire profilassi dell'endocardite batterica con terapia antibiotica.

Organi ipocondriaci

L'epatosplenomegalia da accumulo è comune nei pazienti affetti da MPS I. Raramente in questi pazienti è presente insufficienza d'organo. L'aumentata pressione endoaddominale può invece essere concausa nel determinare ernie ombelicali e inguinali.

Apparato muscolo scheletrico

Tutti i pazienti con forma grave di MPS I sviluppano alterazioni progressive scheletriche e articolari che causano grave limitazione funzionale fino alla perdita totale dell'attività motoria (Pastores e Meere, 2005). Sono caratteristiche della disostosi multipla la deformità della colonna vertebrale (cifosi, scoliosi), le alterazioni costali, la displasia e la sub-lussazione dell'anca, il valgismo e il varismo degli arti. Alcune di queste deformità scheletriche possono richiedere interventi di chirurgia ortopedica elettiva a carico della colonna e degli arti. La funzione dell'articolazione e la rigidità possono trovare giovamento da terapie fisioterapiche riabilitative. Di particolare rilevanza clinica appare l'instabilità della colonna cervicale, causata dall'ipoplasia del dente dell'epistrofeo,

per i risvolti legati all'iperestensione della regione cervicale in corso di manovre cruenta, quali l'anestesia generale o la rapida mobilizzazione in seguito a traumi.

Le alterazioni anatomiche della colonna vertebrale (cervicale e/o dorso-lombare) possono inoltre causare una progressiva compressione sul midollo spinale con conseguenti severe alterazioni funzionali che in casi selezionati possono richiedere interventi mirati di decompressione.

Tutti i pazienti con MPS I dovrebbero eseguire periodica valutazione radiologica, ortopedica e fisiatrica per valutare il progredire delle alterazioni scheletriche, il grado di rigidità articolare ed attuare tempestivamente gli interventi atti a sostenere ove possibile la funzione motoria e il tono muscolare.

Apparato visivo

L'opacità corneale è uno dei sintomi più frequenti e può essere causa di una grave perdita di capacità visiva (Wraith JE, 1995). Inoltre sono stati descritti anche casi di glaucoma e degenerazioni retiniche.

I pazienti dovrebbero essere sottoposti a valutazione oculistica completa, compresa la misurazione della pressione bulbare almeno una volta l'anno.

Sistema Nervoso Centrale

L'idrocefalo comunicante è comune nei bambini affetti dalla forma severa di MPS I, sostenuto dall'ispessimento delle leptomeningi causato dall'accumulo di GAG che può interferire con il riassorbimento del liquido cefalorachidiano da parte delle granulazioni del Pacchioni (Dekaban e Constantopoulos, 1977). L'aumento della pressione intracranica può determinare cefalea e un rapido declino cognitivo in alcuni individui, mentre in altri l'insorgenza può essere progressiva e insidiosa. E' quindi importante monitorare periodicamente con RMN o TAC encefalo la situazione ventricolare e posizionare tempestivamente una derivazione ventricolo-peritoneale al fine di evitare danni permanenti dovuti all'ipertensione intracranica quali danni cerebrali o l'atrofia del nervo ottico. Con la progressione del danno cerebrale, che si manifesta con progressiva atrofia cerebrale, alcuni pazienti presentano crisi epilettiche in genere sensibili alla terapia antiepilettica.

Sviluppo cognitivo

Il ritardo dello sviluppo mentale diventa evidente nel primo e secondo anno di vita, pur essendo conservate, almeno inizialmente, discrete abilità nella socializzazione. (Neufeld e Muenzer, 2001). I bambini presentano un ritardo nell'acquisizione delle tappe dello sviluppo, quindi si assiste ad un blocco delle acquisizioni e successivamente ad una degenerazione neurologica progressiva. Le

difficoltà nel linguaggio possono avere anche delle concause, prima fra tutte l'ipoacusia, ma anche l'ipertrofia linguale e le alterazioni dell'articolazione temporomandibolare.

I pazienti dovrebbero eseguire con frequenza regolare sedute di terapia psicologica e logopedica specie durante i primi anni di vita.

FORMA ATTENUATA

Nei pazienti con la forma attenuata di MPS I la diagnosi è spesso ritardata, anche di diversi anni, fino a quando la progressione dei sintomi non si rende evidente, suggerendo l'ipotesi diagnostica di patologia da accumulo.

Alte e basse vie aeree

La maggior parte dei pazienti sviluppa un certo danno dell'udito, generalmente nelle alte frequenze. Inoltre può instaurarsi una patologia cronica dei seni paranasali. E' quindi raccomandabile l'esecuzione di visita ORL ed esame audiometrico almeno una volta l'anno.

L'apnea notturna ostruttiva e la pnemopatia restrittiva possono tardivamente esitare in una insufficienza respiratoria cronica.

I pazienti dovrebbero eseguire routinariamente valutazioni broncopneumologiche. Esame spirometrico e studi del sonno dovrebbero essere eseguiti prima di un'anestesia e comunque periodicamente.

Sistema cardiovascolare

La patologia cardiovascolare in questi pazienti è generalmente di tipo valvolare mitralico e aortico con stenosi o insufficienza. La profilassi delle endocarditi batteriche con terapia antibiotica è raccomandabile prima degli interventi dentali e chirurgici.

Valutazione cardiologica ed ecocardiogramma con ECG dovrebbero essere eseguiti alla diagnosi e periodicamente per valutare la progressione del coinvolgimento cardiologico.

Apparato muscolo scheletrico

La patologia scheletrica può rappresentare l'elemento predominante nella MPS I attenuata e può variare da forme gravi a forme lievi. I pazienti, generalmente di bassa statura, soffrono di progressive ed ingravescenti limitazioni articolari che limitano le capacità motorie dei soggetti, fino alla completa impotenza funzionale. E' possibile prevedere interventi di fusione vertebrale o osteotomie in caso di gravi deformità, a carico della colonna vertebrale quali cifosi e/o scoliosi.

Fisioterapia ed idroterapia sono utili per alleviare il dolore da rigidità articolare. A volte è raccomandabile l'applicazione di tutori per mantenere corretta la posizione dell'articolazione e prevenire deformità flessorie stabili.

Consigliabile il controllo ortopedico periodico. Utili sono i controlli radiografici e fisiatrici per misurare lo stato di progressione della rigidità scheletrica e per intervenire al fine di mantenere la mobilità articolare e la forza muscolare.

Apparato visivo

L'opacità corneale è una complicanza diffusa ma con grado variabile (Grupcheva et al, 2003). Raramente può instaurarsi glaucoma. La valutazione oculistica dovrebbe essere eseguita al momento della diagnosi di MPS I attenuata e successivamente ogni anno.

Sistema nervoso centrale e periferico

In pazienti con MPSI/S l'RMN encefalo ha mostrato anomalie di segnale prevalentemente nella sostanza bianca periventricolare. Atrofia cerebrale e ventricolomegalia sono anche stati riportati in letteratura (Matheus et al, 2004). Non chiara è ancora la correlazione con il quadro clinico.

La compressione del midollo spinale e l'instabilità cervicale si sviluppano più tardivamente rispetto alla forma severa di MPS I e sono spesso sottodiagnosticati nei pazienti con la forma attenuata di MPS I. Il rilievo di andatura anomala, variazioni sensoriali, debolezza agli arti deve far sospettare una compressione spinale. I potenziali evocati sensoriali possono essere utili per individuare compressioni spinali precoci.

La sindrome del tunnel carpale è sintomo frequente nella fase precoce della malattia nella forma attenuata e determina dolore notturno o parestesie (Wraith e Alani, 1990; Haddad et al, 1997; Van Haest et al, 1998).

L'accumulo patologico nei fibroblasti potrebbe interferire con l'attività muscolare risultandone un'intolleranza all'esercizio fisico (Verrips et al, 2001).

Valutazione neurologica e studi di conduzione nervosa dovrebbero essere eseguiti al momento della diagnosi e successivamente ogni 1-2 anni.

Sviluppo cognitivo

E' generalmente normale. Alcuni pazienti possono avere problemi comportamentali o difficoltà nell'apprendimento per cui si possono giovare di trattamento psicologico e logopedico.

DIAGNOSI

Come per le altre forme di mucopolisaccaridosi, il dosaggio dei GAG urinari costituisce il test di primo livello nell'approccio alla diagnosi. E' possibile effettuare la valutazione quantitativa dell'escrezione totale dei GAG e lo studio semiquantitativo delle varie frazioni. La diagnosi si basa poi sul dosaggio dell'attività dell' α -L-iduronidasi su fibroblasti, leucociti o siero. E' anche disponibile l'analisi molecolare del DNA, utile ai fini anche della programmazione familiare .

Nei pazienti con la forma attenuata di MPS I la diagnosi è spesso ritardata, fino a che la progressione dei sintomi non suggerisce una patologia da accumulo.

Benché i pediatri e i medici di base siano in genere i primi ad essere consultati, altre manifestazioni cliniche come infezioni ricorrenti, alterazioni scheletriche, ernie, spesso portano a rivolgersi ad altri specialisti. Diviene sempre più importante fare una diagnosi precoce in modo da ridurre la progressione della patologia ed assicurare il trattamento più idoneo.

TRATTAMENTO

Trapianto di cellule staminali ematopoietiche

Per trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) si intende una procedura finalizzata al trapianto di cellule metabolicamente normali derivate dal midollo osseo (BMT), dal sangue periferico (PBSCT) o dal cordone ombelicale (CBT) di donatori correlati o non correlati.

L'HSCT è il trattamento di scelta per la forma grave di MPS I, se eseguito il più precocemente possibile, prima che intervengano significativi danni somatici e neuropsichici, cioè prima dei 18-24 mesi e, se possibile, attorno all'anno d'età. E' un trattamento efficace per molti aspetti somatici della malattia e, soprattutto, in grado di modificare l' "outcome" neuropsichico del paziente. La decisione trapiantologica per lo specifico caso deve essere frutto di un'articolata ed esaustiva valutazione del paziente e di un confronto multidisciplinare, in pieno accordo con la famiglia. Al momento della definizione dell'eleggibilità del paziente al trapianto si deve poter formulare la valutazione probabilistica che nello specifico caso si possa ottenere la sopravvivenza con le migliori capacità intellettive e autonomia personale possibili, altrimenti il paziente non dovrebbe essere considerato candidabili.

L'attecchimento del trapianto determina una rapida riduzione dell'accumulo di GAG nel fegato, tonsille, congiuntiva, liquido cerebrospinale e urine, previene o stabilizza l'ostruzione respiratoria, l'idrocefalo e la cardiomiopatia; il trapianto non sembra produrre effetti clinici sufficientemente rilevanti sull'evoluzione del danno scheletrico, mentre quelli sull'apparato visivo sono ancora mal definiti.

La sopravvivenza globale dopo trapianto prevalentemente da donatore non correlato e anche “mismatched” nei pazienti Hurler in Europa è stata pari ad almeno l’85% nell’ultima decade. E’ verosimile che tale dato possa anche essere superiore negli ultimi anni e pertanto il trapianto deve essere ritenuta oggi una procedura, per quanto complicata, estremamente più sicura che in passato e a elevato grado di successo. Nell’ allegato 1 sono ulteriormente approfonditi specifici dettagli e raccomandazioni in merito al trapianto.

Terapia enzimatica sostitutiva (ERT)

Il trattamento con IDUA ricombinante umano (laronidase) [Aldurazyme] per i pazienti affetti da MPS I è stato approvato dopo trial clinico multicentrico negli Stati Uniti ed in Europa.

Lo studio aperto di fase I/II ha dimostrato che in 10 pazienti con MPS I Laronidase somministrato e.v. alla dose di 0.58 mg/Kg (125000 U/Kg) in 4-6 ore, una volta alla settimana, riduceva i livelli urinari di GAG fino al 66% nel primo anno e a livelli quasi normali in tre anni (Kakkis et al, 2001).

Lo studio di fase III, a doppio cieco, condotto su 45 pazienti randomizzati di età media 15.5 anni, di cui l’82% affetti dalla sindrome di Hurler-Scheie, per 26 settimane ha confermato che laronidase procura un miglioramento clinico significativo specie nelle forme più attenuate e che è ben tollerato. L’efficacia del trattamento è stata valutata principalmente sull’aumento della percentuale del valore di FVC e il miglioramento del test del cammino per 6 minuti (6MWT). Ulteriori parametri valutati tra i due gruppi di studio dall’inizio alla 26° settimana erano l’indice apnea/ipopnea, attività flessoria media di entrambe le spalle, Disability Score Index del CHAQ per i pazienti di età inferiore ai 18 anni e del HAQ per quelli più grandi. I pazienti avevano inoltre una significativa riduzione dell’epato(spleno)megalia e del livello urinario di GAG.

E’ stato documentato un solo caso grave di anafilassi e gli eventi avversi quali cefalea, riniti, tosse, diarrea, sono stati simili nei due gruppi di trattamento con enzima e con placebo e facilmente controllati dalla terapia antistaminica. Gli eventi correlati all’infusione erano lievi e simili per incidenza e numero nei due gruppi. Il 93% dei pazienti trattati ha sviluppato anticorpi anti IgG, senza che questo diminuisse l’efficacia o la sicurezza del trattamento (Wraith et al, 2004))

L’apparente incapacità del farmaco di attraversare la barriera ematoencefalica pone dei limiti all’uso dell’ERT nelle forme con interessamento del SNC (Sindrome di Hurler). Esso però può indurre un significativo miglioramento clinico in attesa di eseguire trapianto da donatore compatibile. Inoltre nei pazienti che sono stati trapiantati con successo l’ERT può essere indicata in caso di donatore eterozigote o chimerismo sfavorevole, poiché esso può stimolare la produzione dell’enzima naturalmente prodotto dalle cellule del donatore. Inoltre i deludenti risultati del BMT

sulle alterazioni scheletriche potrebbero essere migliorati dall'associazione con la terapia enzimatica sostitutiva. Ulteriori studi sono però necessari (Wraith JE, 2001).

Dagli studi eseguiti si evince che il trattamento con ERT migliora la funzionalità osteoarticolare pur non correggendo le alterazioni scheletriche preesistenti.

Considerazioni generali riguardanti pazienti affetti da forma severa e attenuata di MPS I
[vedi allegato 2].

Algoritmo di trattamento [vedi allegato 3].

GESTIONE DEL PAZIENTE CON MPS I

La gestione dei pazienti con MPS I dovrebbe essere effettuata in Centri multispecialistici esperti nel trattamento di tale patologia. La progressività della malattia impone controlli periodici specialistici almeno annuali, meglio se eseguita in un breve ricovero presso una struttura ospedaliera adeguata (Wraith JE, 1995). La tabella 1 riporta gli accertamenti che dovrebbero essere eseguiti alla diagnosi e nei successivi controlli. La frequenza dei controlli va comunque stabilita in base alle necessità di ciascun paziente.

E' utile attenersi ai parametri riportati nella scheda di valutazione per monitorizzare le variazioni cliniche della malattia e seguirne in maniera sistematica il decorso clinico.

I livelli di GAG urinari e le dimensioni della milza e del fegato sono normalmente usati per valutare l'effetto del trattamento, pertanto non sono raccomandati come analisi di routine in pazienti che non sono in trattamento.

Le strategie di gestione e le scelte terapeutiche devono essere stabilite individualmente per ciascun paziente sulla base di vari parametri, quali l'età alla diagnosi, la sintomatologia, il grado e il tipo di complicanze.

REGISTRO

E' stato istituito un registro mondiale delle MPS I. Questo database osservazionale ha lo scopo di aggregare dati sulla malattia al fine di ottenere una migliore valutazione clinica e guidare nelle scelte degli interventi terapeutici. Ulteriori informazioni si possono ottenere su www.MPSregistry.com

BIBLIOGRAFIA

Aldurazyme (Laronidase) Prescribing Information. Biomarin Pharmaceutical Inc. April 2003.

Beesley CE, Meaney CA, Greenland G et al. Clinical Spectrum and Management of Mucopolysaccharidosis Type I: A Clinical Review CME

Beesley CE, Meaney CA, Greenland G, et al. Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations. *Hum Genet.* 2001;109:503-511.

Braunlin EA, Rose AG, Hopwood JJ, et al. Coronary artery patency following long-term successful engraftment 14 years after bone marrow transplantation in the Hurler syndrome. *Am J Cardiol.* 2001;88:1075-1077.

Butman SM, Karl L, Copelands JG. Combined aortic and mitral valve replacement in an adult with Scheie's disease. *Chest.* 1989;96:209.

Clinical Spectrum and Management of Mucopolysaccharidosis Type I: A Clinical Review. *Clinical Perspectives on Lysosomal Storage Disorders.* 2003;11(1). ISSN 1540-3025.

Dekaban AS, Constantopoulos G. Mucopolysaccharidosis type I, II, IIIA and V. Pathological and biochemical abnormalities in the neural and mesenchymal elements of the brain. *Acta Neuropathol (Berl).* 1977; 39(1):1-7.

Gaipa G, Dassi M, Perseghin P et al. Allogeneic bone marrow stem cell transplantation following CD34+ immunomagnetic enrichment in patients with inherited metabolic storage diseases. *Bone marrow Transplant* 2003; 31: 857-860.

Grainger J, Wynn R, Carr T, Wraith E, et al. Stem cell transplantation for mucopolysaccharidoses type 1, Hurler's disease – Results at 5 years follow-up from a single center. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29 (s2): 30.

Grewal SS, Krivit W, Defor TE et al. Outcome of second hematopoietic cell transplantation in Hurler syndrome. *Bone marrow Transplant* 2002; 29: 491-496.

Grewal SS, Wynn R, Abdenur JE et al. Safety and efficacy of enzyme replacement therapy in combination with hematopoietic stem cell transplantation in Hurler syndrome. *Genet Med.* 2005;7(2):143-6.

Grupcheva CN, Craig JP, McGhee CN. *In vivo* microstructural analysis of the cornea in Scheie's syndrome. *Cornea.* 2003; 22:76-9.

Haddad FS, Jones DH, Vellodi A, Kane N, Pitt MC. Carpal tunnel syndrome in the mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *J Bone Joint Surg Br.* 1997;79:576-582.

Hobbs JR, Hugh-Jones K, Barrett AJ, et al. Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet.* 1981;2:709-712.

- [Hulsebos RG, Zeebregts CJ, de Langen ZJ](#). Perforation of a congenital umbilical hernia in a patient with Hurler's syndrome. *J Pediatr Surg*. 2004;39:1426-7.
- Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, et al. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med*. 2001;344:182-188.
- Khan SA, Sehat K., Calthorpe D. Cervical cord compression in an elderly patient with Hurler's syndrome: a case report. *Spine* 2003; 28(16) E313-315.
- Krivit W, Shapiro E, Balthazor M. Hurler syndrome: outcomes and planning following bone marrow transplantation. In: Steward C, Hobbs JR (eds). *Correction of Genetic Diseases by Transplantation* (COGENT). London, UK: COGENT Press; 1995a:25-40.
- Krivit W, Lockman LA, Watkins PA, Hirsch J, Shapiro EG. The future for treatment by bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, globoid cell leukodystrophy, and Hurler syndrome. *J Inherit Metab Dis* 1995b;18:398-412.
- Loberiza FR Jr, Serna DS, Horowitz MM, Rizzo JD. Transplant center characteristics and clinical outcomes after hematopoietic stem cell transplantation: what do we know? *Bone Marrow Transplant*. 2003;31(6):417-21.
- Lowry RB, Renwick DHG, Relative frequency of the Hurler and Hunter syndromes. *N Engl J Med*. 1971;284:221.
- Malone BN, Whitley CB, Duvall AJ, et al. Resolution of obstructive sleep apnea in Hurler syndrome after bone marrow transplantation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1988;15:23-31.
- Masterson EL, Murphy PG, O'Meara A, et al. Hip dysplasia in Hurler's syndrome: orthopaedic management after bone marrow transplantation. *J Pediatr Orthop*. 1996;16:731-733.
- Matheus MG, Castillo M, Smith JK, Armao D, Towle D, Muenzer J. Brain MRI findings in patients with mucopolysaccharidosis types I and II and mild clinical presentation. *Neuroradiology*. 2004;46(8):666-72
- McGovern MM. Lysosomal storage diseases. In: Fauci et al (ed). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14th ed. New York: McGraw-Hill, 1998.
- Miano M, Labopin M, Hartmann O et al. Paediatric Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the paediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39(2):89-99.
- Moore C, Rogers JG, McKenzie JM, Brown TCK. Anaesthesia for children with mucopolysaccharidoses. *Anaesth Intens care*. 1996;24:459-463.
- MPS International Panel: Charles Barnett, Lorne Clarke, Natalie Guffon, Ronald Lacro, Joseph Muenzer, James Ogilvie, Charles Peters, Maurizio Scarpa, Ida Vanessa Schwartz, David Viskchill, Robert Walzer, Ed Wraith
- Myer CMD. Airway obstruction in Hurler's syndrome - radiographic features. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1991;22:91.

Nelson J. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Hum Genet.* 1997;101(3):355-8.

Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw-Hill; 2001:2465-2994.

Odunusi E, Peters C, Krivit W, et al. Genu valgum deformity in Hurler syndrome after hematopoietic stem cell transplantation: correction by surgical intervention. *J Pediatr Orthop.* 1999;19:270-274.

Pastores GM, Meere PA. Musculoskeletal complications associated with lysosomal storage disorders: Gaucher disease and Hurler-Scheie syndrome (mucopolysaccharidosis type I). *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17: 70-8.

Peters ME, Arya S, Langer LO, Gilbert EF, Carlson R, Adkins W. Narrow trachea in mucopolysaccharidoses. *Pediatr Radiol.* 1985;5:225-228.

Peters C, Balthazor M, Shapiro EG et al. Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome. *Blood* 1996;87:4894-902

Peters C, Shapiro EG, Krivit W. Hurler syndrome: past, present, and future. *J Pediatr.* 1998a;133:7-9

Peters C, Shapiro EG, Anderson J, et al. Hurler syndrome: II. Outcome of HLA-genotypically identical sibling and HLA-haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty-four children. The Storage Disease Collaborative Study Group. *Blood.* 1998b;91:2601-2608.

Peters C. Hematopoietic cell transplantation for storage diseases: In: Donnell Thomas G, Blume KG and Forman SJ (eds). *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, Malden, MA: Blackwell Science, 1999.

Peters C, Orchard PJ, Defor TE, et al. Hematopoietic cell transplantation for Hurler syndrome: The University of Minnesota experience from 1983 to 2001. *Blood.* 2001;98:667a.

Peters C, Steward CG. Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 229-239.

Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet.* 1999;105:151-156.

Pyeritz RE. Cardiovascular manifestations of heritable disorders of connective tissue. In: Steinberg AG, Bearn AG, Motulsky AG, Childs B (eds). *Progress in Medical Genetics*. Philadelphia, PA: Saunders; 1983:191.

Rovelli A, Steward C. Hematopoietic cell transplantation activity in Europe for inherited metabolic diseases: open issues and future directions. *Bone Marrow Transplant.* 2005;35 Suppl 1:S23-6.

Scott HS, Guo XH, Hopwood JJ, Morris CP. Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene. *Genomics.* 1992 Aug;13(4):1311-3.

- Scott HS, Litjens T, Nelson PV et al. Identification of mutations in the alpha-L-iduronidase gene (IDUA) that cause Hurler and Scheie syndromes. *Am J Hum Genet.* 1993;53(5):973-86.
- Scott HS, Bunge S, Gal A, et al. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical, and biological implications. *Hum Mutat.* 1995;6:288-302.
- Shapiro J, Strome M, Crocker AC. Airway obstruction and sleep apnea in Hurler and Hunter syndromes. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1985;94:458-461.
- Souillet G, Guffon N, Maire I et al. Outcome of 27 patients with Hurler's syndrome transplanted from either related or unrelated haematopoietic stem cell sources. *Bone marrow Transplant.* 2003; 31: 1105-1117.
- Staba S, Escolar M, Poe M, et al. Cord blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *N Engl J Med.* 2004; 350:1960-1969.
- Shinhar SY, Zablocki H, Madgy DN. Airway management in mucopolysaccharide storage disorders. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004 Feb;130:233-7.
- Terlato NJ, Cox GF. Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature. *Genet Med.* 2003;5:286-294.
- Van Heest AE, House J, Krivit W, et al. Surgical treatment of carpal tunnel syndrome and trigger digits in children with mucopolysaccharide storage disorders. *J Hand Surg Am.* 1998;23:236-243.
- Vellodi A, Young EP, Cooper A, et al. Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I: experience with two British centres. *Arch Dis Child.* 1997;76:92-99.
- Venturi N, Rovelli A, Parini R et al. Molecular analysis of 30 mucopolysaccharidosis type I patients: evaluation of the mutational spectrum in Italian population and identification of 13 novel mutations. *Hum Mutat.* 2002;20(3):231.
- Verrips A, van Engelen BG, ter Laak H, Wesseling P, de Jong J, Gabreels FJ. Scheie syndrome presenting as myopathy. *Neuropediatrics.* 2001 Apr;32(2):93-6.
- Walker RWM, Darowski M, Morris P, Wraith JE. Anaesthesia and mucopolysaccharidoses. *Anaesthesia.* 1994;49:1078-1084.
- Weibel TD, Brady RO. Systematic approach to the diagnosis of lysosomal storage diseases. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001; 7(3):190-199.
- Whitley CB, Belani KG, Chang PN, et al. Long-term outcome of Hurler syndrome following bone marrow transplantation. *Am J Med Genet.* 1993;46:209-218.
- Wilder RT, Belani KG. Fiberoptic intubation complicated by pulmonary edema in a 12-year-old child with Hurler syndrome. *Anesthesiology.* 1990;72:205-207.
- Wraith JE, Alani SM. Carpal tunnel syndrome in the mucopolysaccharidoses and related disorders. *Arch Dis Child.* 1990;65(9):962-3.

Wraith JE. The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management. *Arch Dis Child*. 1995;72:263-267.

Wraith JE. Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type I: progress and emerging difficulties. *J Inherit Metab Dis*. 2001;24:245-250.

Wraith JE, Clarke LA, Beck M et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *J Pediatr*. 2004;144(5):581-8

Tabella 1: valutazioni raccomandate in pazienti con MPS I in ERT, o candidati alla ERT.

(Per i pazienti non candidati alla ERT la frequenza delle valutazioni può essere ridotta e stabilita sulla base delle indicazioni cliniche)

	Baseline	Ogni 6 mesi	Ogni anno	Ogni 2 anni
Anamnesi				
▪ Dosaggio enzimatico	X			
▪ Analisi molecolare	X			
▪ Età alla diagnosi	X			
Esame fisico generale e parametri vitali (compreso PA)*	X	X		
Parametri auxologici (Peso/altezza, Circ cranica)	X	X		
Routine ematochimica ed esame urine	X	X		
Valutazioni clinico-strumentali				
Valutazione neurologica	X		X	
▪ Esame neurologico	X		X	
▪ Test psicometrici	X		X	
▪ Potenziali evocati somatosensoriali (SEP)	X			X
▪ RMN encefalo, RMN rachide, TC cranio e/o giunzione atlanto-occipitale**				
Valutazione oculistica (Acuità visiva, pressione oculare, fondo oculare, esame della cornea)	X		X	
Valutazione ORL	X		X	
▪ Audiometria, visita ORL				
Valutazione respiratoria (Alte e basse vie aeree)				
▪ FVC/FEV1	X	X		
▪ Polisonnografia	X		X	
Valutazione cardiologica	X	X		
▪ ECG	X	X		
▪ Ecocardio-color-doppler				
Apparato locomotore				
▪ Visita fisiatrica e mobilità articolare***	X	X		
▪ Test del cammino dei 6 minuti	X	X		
▪ Visita ortopedica	X		X	
▪ Rx scheletro	X			X ^o
▪ EMG/Velocità conduzione nervo mediano	X			X
GAG urinari	X	X		
Volume fegato e milza (RMN), in alternativa diametro long. lobo epatico dx e diametro long splenico (ecografia)	X	X ^{oo}		

*L'esame clinico, comprensivo della misurazione dei parametri vitali, va praticato anche ad ogni infusione.

** la RMN encefalo + rachide dovrebbe essere praticata al baseline; nel corso del follow-up si può valutare la ripetizione dell'esame RMN o, in alternativa, della TC del cranio e/o giunzione atlanto-occipitale, sulla base dei risultati delle valutazioni neurologiche e dei SEP, e di una valutazione della sicurezza di tali indagini basata sulle condizioni generali del paziente

*** la misura della mobilità articolare passiva, mediante goniometria standard, dovrebbe essere effettuata da un fisioterapista esperto, registrando l'apertura degli angoli articolari a livello di spalla, gomito, polso, 2° dito, anca e ginocchio, caviglia bilateralmente.

^o E' possibile praticare Rx di singoli segmenti scheletrici (al posto dell'Rx scheletro in toto) sulla base delle indicazioni cliniche.^{oo} Per i pazienti non in trattamento o in terapia ma in condizioni stabilizzate, il volume degli organi ipocondriaci può essere valutato con cadenza annuale.

Trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) e Mucopolisaccaridosi tipo I (MPS I).

Introduzione.

Per trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) si intende una procedura finalizzata al trapianto di cellule metabolicamente normali derivate dal midollo osseo (BMT), dal sangue periferico (PBSCT) o dal cordone ombelicale (CBT) di donatori correlati o non correlati.

Da oltre vent'anni l'HSCT è utilizzato nel trattamento di diverse malattie da accumulo lisosomiale (LSD) con risultati importanti in alcune, ancora incerti o negativi in altre. Grazie alla notevole esperienza accumulata e ai continui progressi scientifici, negli ultimi anni è stato possibile iniziare a delineare con maggior chiarezza, almeno per le forme più comuni, indicazioni ai diversi trattamenti disponibili e percorsi terapeutici ragionati (Peters e Steward, 2003; Rovelli e Steward, 2005).

Sfortunatamente, i meccanismi attraverso cui il trapianto risulta efficace non sono ancora del tutto ben elucidati e nemmeno è chiaro perché non sia efficace in malattie dove in linea teorica potrebbe esserlo (ad esempio la Sanfilippo). Vi è un periodo di latenza (6-24 mesi) prima che la malattia venga stabilizzata dal trapianto rendendo necessario estrapolare quali saranno le condizioni del paziente negli stadi successivi nel breve-medio termine prima di decidere la sua eleggibilità al trapianto stesso. Questo periodo di latenza si pensa sia dovuto alla lentezza del ricambio dei macrofagi/istiociti tissutali e delle cellule microgliali cerebrali da parte delle cellule del donatore assieme al tempo necessario al "lavaggio" dei metaboliti tossici accumulati.

In passato, la fonte di cellule staminali era costituita dal midollo di familiari HLA identici, oggi la disponibilità di cellule staminali periferiche o da midollo di donatori non correlati, il trapianto di sangue da cordone ombelicale e la possibilità di superare la barriera HLA con trapianti aploidentici hanno notevolmente ampliato la possibilità dei pazienti con LSD di essere sottoposti ad HSCT.

L'evoluzione, soprattutto nell'ultima decade, dell' "expertise" trapiantologico e della terapia di supporto hanno inoltre consentito di comprimere sensibilmente la mortalità peritrapiantologica acuta (ad esempio, nell'HSCT da familiare genotipicamente HLA identico è in genere <10% e in alcuni Centri anche <5%) e pertanto, in mani esperte, l'HSCT va considerato una procedura molto più sicura che in passato. Non va comunque dimenticato che, pur considerando i rischi trapiantologici, l'aspettativa "naturale" di vita a lungo termine per molte delle patologie eleggibili è pressochè zero.

Il trapianto in utero va considerato invece tuttora una procedura del tutto sperimentale; per diverse ragioni, i pochi trapianti effettuati in epoca pre-natale in soggetti con diverse LSD, sono infatti in genere per lo più falliti.

Il primo trapianto per una malattia lisosomiale (MPS IH) fu effettuato ormai nel lontano 1980. Da allora più di 400 pazienti con forma severa di MPS I sono stati sottoposti ad HSCT in diversi centri (Whitley et al, 1993; Vellodi et al, 1997; Peters et al, 1996; Peters, 1998b et al; Grainger et al, 2002; Grewal et al, 2002; Gaipa et al, 2003; Souillet et al, 2003; Staba et al, 2004), dei quali quasi 200 in Europa (Rovelli e Steward, 2005).

Processo decisionale ed obiettivi del trapianto.

Nel complesso quadro in continua evoluzione della ricerca, della disponibilità di farmaci innovativi e di nuove tecnologie, la decisione trapiantologica per lo specifico caso deve essere frutto di un'articolata ed esaustiva valutazione del paziente e del confronto multidisciplinare tra le diverse competenze (soprattutto metaboliche, neurologiche e trapiantologiche) e deve essere sempre una scelta partecipata con la famiglia.

L'obiettivo del trapianto non può oggi essere semplicemente la sopravvivenza con un adeguato livello enzimatico, ma la sopravvivenza con le migliori capacità intellettive e autonomia personale possibili in grado di tradursi nel mantenimento di un'adeguata qualità della vita.

Al momento della definizione dell'eleggibilità del paziente alla procedura trapiantologica si deve poter formulare la valutazione probabilistica che nello specifico caso questo risultato possa essere ottenibile, altrimenti il paziente non dovrebbe essere considerato candidabile.

Indicazioni.

L'HSCT è un trattamento efficace per la forma grave di MPS I, se eseguito il più precocemente possibile rispetto all'insorgenza della degenerazione neurologica (Peters e Steward, 2003). L'esperienza con l'HSCT nella MPS I grave è notevole, al punto che per l'EBMT (European Blood and Marrow Transplantation Group) la procedura oggi non è più considerata di ricerca, ma è anzi classificata come "routine" trapiantologica.

Il successo clinico dell'HSCT dipende non solo dal tipo di donatore e dalla capacità di attecchimento del trapianto, ma soprattutto dall'età del bambino al momento del trapianto e dal suo grado di compromissione d'organo e neurologica. Il deterioramento delle funzioni cerebrali inizia precocemente nel bambino non trapiantato e può già essere molto evidente a 2-3 anni d'età. Per prevenire efficacemente la perdita delle funzioni mentali, l'HSCT deve essere eseguito quanto prima possibile, idealmente prima dei 12 mesi di vita e comunque non oltre i 18-24 mesi (Peters C, 1999; Neufeld e Muenzer, 2001; Peters e Steward, 2003). La letteratura internazionale, oltre all'età, considera un $QI \geq 70$, come altro criterio fondamentale per definire l'eleggibilità del paziente all'HSCT. Tale quoziente corrisponde, secondo i test usati, a un DQ (developmental quotient) ≥ 70

e ad un GQ (general quotient = età mentale/età anagrafica) ≥ 70 . L'indicazione del limite d'età per l'HSCT, non è, peraltro, assoluta e restrittiva: possono essere individuati pazienti di età superiore, ma con compromissione d'organo ed intellettuale ancora modeste da non controindicare una loro eleggibilità al trapianto. Inoltre, in generale, criterio aggiuntivo per la selezione del candidato è l'assenza di alterazioni d'organo o apparato incompatibili con la tossicità attesa della procedura (ad esempio, frazione d'eiezione cardiaca particolarmente compromessa).

La scelta della miglior fonte di cellule staminali (donatore) e il tipo e modalità di trapianto per lo specifico caso dipende da molti fattori e spesso è un percorso complesso negli aspetti decisionali ed organizzativi. Il processo di identificazione di donatori compatibili per l'HSCT include la tipizzazione ed il confronto degli antigeni HLA. In realtà il concetto di compatibilità HLA è costantemente in evoluzione di anno in anno e lo stesso concetto di compatibilità è oggi qualcosa di più complesso rispetto al solo HLA.

L'attività enzimatica leucocitaria del donatore deve essere sempre testata. Per quanto non vi siano dati conclusivi circa il vantaggio o meno dell'uso di un donatore "non-carrier" vs. un donatore eterozigote, livelli enzimatici superiori ottenuti nel post-trapianto in pazienti MPS I correlano con un migliore "outcome".

Tutti i pazienti avviati all'HSCT devono avere la diagnosi molecolare di MPS IH, questo non solo per consentire studi fenotipo-genotipo, ma per poter valutare in futuro l'impatto del genotipo sull'"outcome" trapiantologico.

Scelta del Centro Trapianti.

I Centri Trapianto hanno diverse tipologie a seconda dell'"expertise" e dei livelli di accreditamento (Loberiza et al, 2003; vedi anche www.ebmt.org; www.gitmo.net; www.aieop.org). E' fortemente raccomandato dalle organizzazioni internazionali (Working Party Inborn Errors - European Blood and Bone Marrow Transplantation Group Meeting, Vitznau, CH, Sett. 2002 e Gunzburg, D, Nov. 2004) che i trapianti per queste patologie vengano effettuati da Centri Trapianto ad alta specialità con provata esperienza per trapianti allogenici, in particolare con l'uso e manipolazione di cellule staminali da donatore non correlato e dove esista quella complessa interdisciplinarietà in grado di gestire tutte le possibili complicanze post-trapiantologiche in questa particolare categoria di pazienti ad alto rischio.

Risultati: sopravvivenza.

La preparazione pre-trapianto deve essere sufficientemente immunosoppressiva e mieloablative per ottimizzare l'attecchimento e la sua stabilità nel tempo (Peters 1998a). Procedure di manipolazione

(ad esempio T-deplezione) del materiale cellulare infuso e specifici trattamenti farmacologici possono ridurre la morbidità e mortalità precoci, ma per converso possono aumentare il rischio di chimerismo misto e rigetto che, per ragioni non ancora del tutto chiarite, sembrano avere una maggior frequenza nei pazienti affetti da MPS I (Peters et al, 1998a; Grewal et al, 2002; Gaipa et al, 2003; Rovelli e Steward, 2005).

Nell'affrontare la tematica trapianto, non va dimenticato comunque che i pazienti con forma severa, non trapiantati e non altrimenti trattati, hanno una mortalità "naturale" pressochè del 100% con una sopravvivenza compresa tra i 5 e i 15 anni d'età.

I rischi di morbidità e mortalità usualmente associati all'HSCT vanno considerati con cautela, riferendosi in genere a casistiche limitate, distribuite in un arco temporale eccessivo e comprensive di pazienti diversi per fattori di rischio e tipologia di trapianto: una mortalità del 10-20% in trapianti da familiari compatibili per HLA o del 40-60% in trapianti non completamente compatibili per gli antigeni HLA (Krivit et al, 1995a; Neufeld e Muenzer, 2001; Peters et al, 2001) non può oggi essere un dato realistico e accettato. Esperienze più recenti, addirittura nel caso di trapianti prevalentemente non da familiare e con diversi gradi di incompatibilità, mostrano una sopravvivenza con persistenza nel tempo di trapianti funzionali e risultati molto favorevoli a lungo termine, nei pazienti con la forma severa di MPS I, pari al 78-85% dei casi con una mortalità correlabile alla procedura trapiantologica attorno al 10-15% (Gaipa et al, 2003; Souillet et al, 2003; Staba et al, 2004), cioè per lo meno pari al dato di sopravvivenza storico, 85%, della casistica globale di tutte le LSD sottoposte a BMT da familiare assolutamente compatibile in Europa negli ultimi vent'anni (Miano et al, 2007). Il successo del trapianto è fortemente influenzato dalla presenza di uno dei seguenti fattori di rischio: età > 2 anni, idrocefalo non derivato, storia di significative complicanze polmonari, storia di grave compromissione cardiaca, GQ<70 al trapianto. La presenza di uno di questi fattori di rischio abbatte la probabilità di sopravvivenza a 5 anni dall'85% al 45%. L'eleggibilità al trapianto convenzionale di questi pazienti (cosiddetti ad alto rischio) andrebbe discussa; eventualmente potrebbero essere obbiettivo di studi per procedure o terapie innovative (trapianti a ridotta intensità o non mieloablativi).

Risultati sul danno d'organo.

L'attecchimento del trapianto determina una rapida riduzione dell'accumulo di GAG nel fegato, tonsille, congiuntiva, liquido cerebrospinale e urine. I sintomi dell'ostruzione respiratoria, compresa l'apnea notturna, si riducono drammaticamente (Malone et al, 1988). Nei pazienti candidati all'HSCT l'adenotonsillectomia, salvo casi particolari, non deve essere eseguita pre-trapianto poiché il regime di condizionamento riduce immediatamente questi tessuti con risoluzione degli episodi di

apnea notturna. L'idrocefalo viene prevenuto o stabilizzato. Il rischio di tachiaritmie e scompenso congestizio viene eliminato entro un anno dal trapianto, la cardiomiopatia migliora o viene stabilizzata e la persistenza di pervietà coronaria è stata documentata sino anche a 14 anni dal trapianto (Braunlin et al, 2001). Le anomalie valvolari tuttavia persistono al trattamento con HSCT e possono progredire in una parte dei casi richiedendo le opportune correzioni chirurgiche (Peters et al, 1998; Peters C, 1999). L'HSCT sembra migliorare la capacità uditiva in almeno il 30-40% dei bambini, ma non è in grado ovviamente di revertire danni uditivi di tipo conduttivo e sensorio-neuronale già profondamente stabilizzatisi (Krivit et al, 1995b). Nonostante in un discreto numero di pazienti l'opacizzazione corneale sembra arrestarsi o addirittura ridursi e la pressione oculare normalizzarsi (Peters C, 1999), sono stati riportati alcuni casi che hanno necessitato comunque trapianto di cornea dopo un HSCT eseguito con successo. Purtroppo la disostosi multipla non sembra significativamente trarre beneficio dall'HSCT ed i bambini più gravemente affetti richiedono comunque negli anni successivi interventi ortopedici multipli (Masterson et al, 1996; Odunusi et al, 1999; Van Haest et al, 1998; Krivit et al, 1995a).

Nel primo anno post-HSCT è inoltre possibile un ulteriore declino delle funzioni neuropsichiche prima della stabilizzazione. Fondamentale, ai fini di ulteriormente migliorare le possibilità di sviluppo neuropsichico post-trapianto, è associare il più precocemente possibile un'intensa terapia riabilitativa (fisioterapia, terapia occupazionale, logopedia, ecc.). Tutti i pazienti sia pre- che post-HSCT devono essere sottoposti a valutazioni specifiche che definiscano lo stato dei diversi apparati, organi e funzioni sia relativamente alla malattia di base che per i rischi di tossicità trapiantologica a breve e lungo-termine: esame neurologico e neuropsicometrico, neuroradiologico, oculistico, audiologico, cardiorespiratorio, ortopedico ed endocrinologico.

Il regime di condizionamento pre-trapianto

Esistono tuttora numerosi problemi aperti in ambito trapiantologico. Infatti, non è stato ancora definito quale possa essere il miglior trattamento di preparazione al trapianto nei pazienti con LSD; tale terapia deve essere modulata in considerazione degli specifici danni d'organo del singolo paziente e del possibile danno al sistema nervoso centrale senza compromettere eccessivamente la necessità di immunosoppressione finalizzata all'ottenimento e conservazione dell'attecchimento. Regimi di condizionamento innovativi con trattamenti irradianti particolari o regimi a ridotta intensità, in questo contesto, andrebbero applicati solo con criteri di sperimentaltà. La maggioranza dei Centri internazionali ha optato per regimi senza panirradiazione corporea (total body irradiation, TBI) al fine di ridurre la tossicità neurologica e per una profilassi della malattia

trapianto verso l'ospite (graft-versus-host disease, GvHD) spesso basata in passato sulla T-deplezione, con diverse tecnologie, allo scopo di evitarne i suoi effetti demielinizzanti.

Recentemente un pannello di esperti di trapianto nelle malattie metaboliche a livello europeo (Inborn Errors Working Party dell' European Blood and Marrow Transplantation Group), esaminati i dati oggi disponibili, ha formulato delle raccomandazioni in merito che sono ora disponibili per i Centri Trapianto affiliati al sito www.ebmt.org. La ricerca di un potenziale donatore non correlato o di una unità cordonale va attivata in parallelo e non in tempi successivi come prassi di molti centri trapianto. Nella selezione di un' unità di sangue cordonale non correlata, la cellularità di questa è un fattore molto importante (minimo ≥ 3.7 , ma ottimale $\geq 5 \times 10^7$ /kg cellule nucleate totali). Si suggerisce di evitare manipolazioni del prodotto infusionale e di utilizzare come regime di condizionamento busulfano + ciclofosfamide. La non T-deplezione e la maggior immunosoppressione sono motivate dal ridurre il rischio di chimerismo misto o rigetto; peraltro tale regime, anche con dosi più alte di ciclofosfamide, si è dimostrato ben tollerato nei pazienti MPS I. Nel caso di trapianti alternativi (trapianto aploidentico) ovviamente la T-deplezione (con selezione positiva o negativa) è necessaria e viene suggerita l'inclusione della fludarabina nel regime di condizionamento.

Il problema del chimerismo.

La procedura trapiantologica nell' MPS I-H è gravata, per ragioni non ancora chiarite, da una discreta incidenza di rigetto e chimerismo misto, non giustificata semplicemente dalle procedure di manipolazione del prodotto infusionale. Un secondo trapianto si è reso necessario nel 18% dei casi con MPS I trapiantati con diverse modalità e riportati al Registro Europeo dell' EBMT nell'arco degli ultimi vent'anni (Rovelli e Steward, 2005). Diverse le possibili ragioni di ciò, ma un punto rilevante sono le modalità di preparazione e manipolazione del trapianto, purtroppo spesso diverse da centro a centro. Un'intensificazione dei farmaci usati nella preparazione potrebbe ridurre il problema, ma potrebbe aumentare la tossicità ai diversi organi, fragili per il materiale "accumulato". Recentemente vi sono sperimentazioni con nuovi farmaci, uso di dosi di cellule staminali più alte e infusioni in tempi successivi di cellule particolari del donatore ripartite nel tempo: di tutto questo ancora non vi sono dati controllati.

Il monitoraggio semiquantitativo o quantitativo del chimerismo e dei livelli enzimatici deve essere sempre obbligatoriamente e periodicamente effettuato nel post-trapianto, in modo via via dilazionato nel tempo, sino a conferma della stabilizzazione.

Il secondo trapianto è però risultato fattibile con ancora significative probabilità di successo (Grewal et al, 2002) e questa possibilità dovrebbe già essere contemplata al momento del primo colloquio informativo con la famiglia. I pazienti con chimerismo misto vanno monitorati nel

tempo, vi sono pazienti con chimerismo misto, anche di poco superiore al 10%, con normali livelli enzimatici e con benefici trapiantologici in linea con quelli valutabili in pazienti chimere complete. Procedure alternative, ad esempio infusioni frazionate di linfociti CD3+ del donatore (Gaipa et al, 2003), in caso di chimerismo misto, sono scelte complesse e di natura sperimentale.

ERT ed HSCT.

Nessun dato veramente conclusivo è oggi disponibile circa gli eventuali vantaggi o svantaggi dell'uso della ERT associata al trapianto. L'eventuale impiego pre-HSCT potrebbe avere il razionale di ridurre l'incidenza e/o la gravità dei danni d'organo correlati alla malattia con l'obiettivo di prevenire alcune complicanze peritrapiantologiche. Un'importante nota di cautela però deriva dal fatto che non è noto se eventuali risposte immuni all'enzima esogeno possano poi, nel contesto dei fenomeni immunologici più complessi post-HSCT, contribuire al rigetto o ad altri eventi potenzialmente in grado di ridurre l'efficacia del trapianto. Risultati di esperienze non controllate preliminari sembrano suggerire che l'ERT pre-trapianto non sembra avere un impatto sul rischio di rigetto e sul rischio di complicanze polmonari post-trapianto (Grewal et al, 2005). In attesa di studi specifici che rispondano a questi quesiti, si potrebbero ritenere ragionevoli le seguenti due opzioni: (1) non considerare l'eventuale ERT pre-HSCT per tutti quei casi diagnosticati in modo relativamente precoce nei quali ancora siano assenti o relativamente modesti gli eventuali danni d'organo e per i quali i tempi per la procedura trapiantologia siano prospettabili estremamente brevi (≤ 1 mese), come può succedere nel caso di un CBT; (2) effettuare ERT pre-HSCT in tutti quei casi dove la possibile evoluzione del danno d'organo, per i tempi d'attesa rispetto al trapianto, possa essere ritenuta tale da porre a rischio il paziente e compromettere le probabilità di successo del trapianto.

Già a 2-4 settimane i livelli enzimatici leucocitari, nella quasi totalità dei riceventi di trapianto con sangue midollare, sono normali (tale tempo può essere maggiore nel caso di CBT). L'ERT post-trapianto può essere interrotta una volta documentati livelli normali endogeni di enzima. Il trattamento con ERT post-trapianto in modo protratto è giustificato solo nel contesto di studi specifici. L'eventuale ERT post-trapianto può essere impiegata nei casi con rigetto, nell'attesa del secondo trapianto, se l'intervallo prevedibile tra il rigetto e la nuova procedura risulti eccessivamente lungo. Nei pazienti non candidabili ad un secondo HSCT, il ruolo dell'ERT ha le stesse implicazioni del trattamento dei casi di MPS I grave non eleggibili a trapianto.

Allegato 2

Considerazioni generali riguardanti pazienti affetti da forme severe e attenuate

Procedure Anestesiologiche

La quasi totalità dei pazienti con MPS I sono soggetti ad altissimo rischio anestesilogico. Il rischio anestesilogico aumenta proporzionalmente all'età del paziente a causa del progredire della malattia. La presenza di ostruzione delle vie aeree superiori a vari livelli, dall'ipertrofia linguale, all'ipertrofia adenotonsillare fino alla presenza di stenosi tracheali può determinare difficoltà di intubazione, (Wilder e Belani, 1990; Walker et al, 1994; Moores et al, 1996) . L'accumulo di GAG nelle vie aeree limita considerevolmente la possibilità di visualizzare la laringe con il laringoscopio. I movimenti molto limitati della mandibola, la brevità del collo, la macroglossia, e le secrezioni molto abbondanti possono impedire la visualizzazione della laringe anche al più esperto degli anestesisti. L'instabilità spinale inoltre, specialmente della giunzione dell'asse atlanto-occipitale, impone di non eseguire manovre di iperestensione cervicale nel corso dell'intubazione. Immagini radiologiche dell'instabilità cervicale e della pervietà delle prime vie aeree dovrebbero essere quindi eseguite preventivamente.

Si raccomanda inoltre di effettuare l'intubazione mediante fibroscopio, e, a causa della riduzione del diametro tracheale, di utilizzare cannule endotracheali di calibro ridotto rispetto a quello che sarebbe richiesto dall'età del paziente.

Infine i pazienti possono soffrire di ostruzione delle vie aeree post-estubazione e quindi è raccomandabile tenere il paziente in osservazione per un certo tempo dopo la procedura. E' importante che i genitori vengano messi al corrente che a volte può essere necessaria una trachetomia post-operatoria.

E' raccomandabile, quindi, che pazienti con MPS I che debbano essere sottoposti ad anestesia generale siano trattati in centri con provata esperienza pronti a fronteggiare emergenze rianimatorie.

Apparato dentario

I pazienti affetti da MPS soffrono comunemente di gengiviti, carie dentarie, cisti, ascessi, alterazioni della crescita e della morfologia dentale che devono essere considerate attentamente dato che possono essere una delle più frequenti cause di dolore.

In particolare devono essere controllate le cisti dentali che devono essere trattate con adeguata terapia antibiotica, analgesica e massaggi gengivali.

Sarebbe importante osservare un'appropriata igiene dentale anche a casa con controlli odontoiatrici periodici. Per alcuni pazienti potrebbe essere richiesta l'anestesia anche solo per un controllo.

Pertanto siccome questi pazienti sono ad elevato rischio anestesilogico, sarebbe opportuno che le procedure odontostomatologiche richiedenti anestesia generale vengano condotte in ospedale da parte di anestesisti esperti in complicanze legate alla MPS.

Il dentista dovrebbe essere un dentista pediatra in grado di effettuare anche controlli radiologici regolari.

Ogni paziente dovrebbe essere controllato da un dentista almeno ogni 6 mesi.

Ernie

Generalmente le ernie inguinali vengono corrette chirurgicamente addirittura prima che venga posta la diagnosi di MPS. Le ernie ombelicali possono essere altrettanto frequenti particolarmente nelle forme severe e possono essere anche recidivanti a causa di una lassità del tessuto connettivo tipico della MPS.

Un'epatosplenomegalia massiva può essere causa di addome batracico e aumentare il volume delle ernie inguinali e ombelicali.

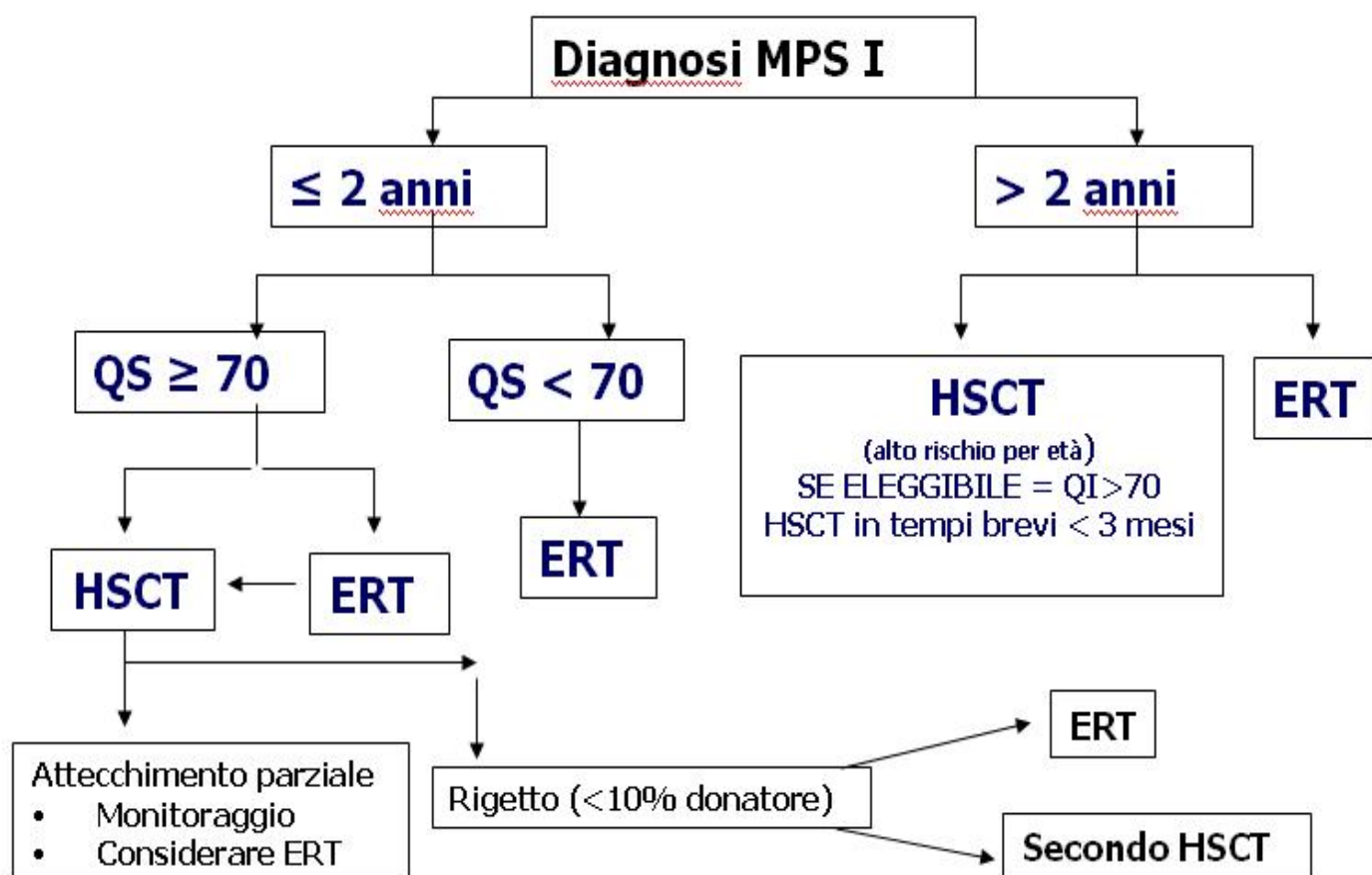
Nella forma attenuata di MPS I le ernie inguinali e ombelicali sono meno frequenti.

Apparato gastroenterico

In pazienti affetti da MPS I sono frequenti episodi di alternanza di diarrea e stipsi che possono essere modificati mediante l'uso di regimi dietetici adeguati e lassativi.

Il dolore addominale è un sintomo frequente anche in pazienti affetti da MPS I attenuata.

RACCOMANDAZIONI MPSI



MUCOPOLISACCARIDOSI DI TIPO I (MPSI)

RACCOMANDAZIONI PER LA TERAPIA ENZIMATICA SOSTITUTIVA (ERT): CRITERI DI INCLUSIONE, ESCLUSIONE ED USCITA.

PREMESSA

Per essere valutati per il trattamento, i pazienti o i tutori legali devono firmare un consenso informato (un “contratto”) per accettare i criteri di inclusione, esclusione ed uscita dalla terapia e la richiesta di compliance al trattamento e al follow-up.

CRITERI DI INCLUSIONE (1-3)

1. Dovrebbero essere considerati per il trattamento immediato i pazienti con MPSI senza interessamento neurologico o con lieve interessamento neurologico, con almeno uno tra i seguenti segni o sintomi:

1A. Segni di ostruzione delle vie aeree superiori, come sindrome delle apnee ostruttive del sonno, diagnosticate mediante polisonnografia, e definite come indice apnea/ipoapnea >5 negli adulti o >1 nei bambini, o saturazione di ossigeno notturna $<85\%$ negli adulti o $<92\%$ nei bambini.

Nota: l'indice apnea/ipopnea è il numero medio di apnee o ipopnee per ora di sonno.

1B. Storia di difficoltà d'intubazione; uso di pressione positiva continua (CPAP) o BiPAP, che indicherebbero una significativa ostruzione delle vie aeree superiori.

1C. Coinvolgimento respiratorio sintomatico, o asintomatico, incluso insufficienza respiratoria restrittiva, quando confermato da test di funzionalità respiratoria che indichino una capacità vitale forzata $<80\%$ del predetto.

1D. Disfunzione miocardica, indicata da una riduzione della frazione di eiezione a $<56\%$ (Valori normali 56-78%).

1E. Evidenza di ridotta resistenza allo sforzo definita mediante test del cammino dei 6 minuti (6MWT). Tale test è stato utilizzato in un trial clinico pilota come endpoint primario di efficacia, ma i valori normali dipendono dall'altezza e dalla lunghezza del passo e non esistono al momento valori di riferimento per i bambini. Attualmente quindi si considera funzionalmente importante per attività quali attraversare la strada o effettuare una commissione nel quartiere, una capacità di deambulazione alla velocità normale di 80 metri/minuto per 332 metri. Quindi si suggerisce che una distanza percorsa al 6MWT di <300 metri debba essere considerata un'indicazione al trattamento.

Nota: Il valore medio basale del percorso ottenuto al 6MWT nei pazienti arruolati nello studio di fase III era 319 metri.

1F. Pazienti con sintomi e segni suggestivi di aumentata pressione intracranica come cefalea ricorrente e papilledema.

2. I pazienti senza interessamento neurologico che non rispondono ai precedenti criteri dovrebbero essere valutati sistematicamente ogni 6 mesi per mettere in evidenza precocemente un'eventuale progressione della malattia e per rivalutare dunque nel tempo la loro inclusione in terapia con ERT. L'evidenza di progressione è stabilita da:

- Una riduzione di almeno il 10% del valore percentuale della capacità vitale forzata rispetto al predetto

- Una riduzione di almeno il 10% della frazione di eiezione
- Una riduzione di almeno il 10% della distanza percorsa al 6MWT

in assenza di complicanze specifiche di malattia suscettibili di terapia chirurgica, come lesione valvolare cardiaca o mielopatia cervicale.

Nota: il valore del 10% è arbitrario e suscettibile di revisione, in quanto non esistono dati specifici al riguardo.

Questi pazienti possono essere considerati invece eleggibili di trattamento immediato soltanto in presenza di forte motivazione da parte dei pazienti e/o delle famiglie; dovrebbero in tal caso ricevere dettagliate informazioni riguardo l'efficacia, la sicurezza dell'ERT (incluso la possibile insorgenza di effetti collaterali), il protocollo di follow-up (frequenza delle infusioni e procedure di valutazione clinico-strumentali). Dovrebbero essere chiaramente coscienti della mancanza di una evidenza chiara che la ERT sia efficace nel prevenire l'insorgenza di problemi clinici correlati alla malattia sottostante sebbene, analogamente a quanto dimostrato per la Malattia di Gaucher, l'efficacia della ERT nel prevenire le manifestazioni cliniche non neurologiche sia molto probabile.

3. I pazienti con MPSI Hurler (con fenotipo severo ed età di esordio <2 anni) sono eleggibili per ERT nei seguenti casi:

3A. Pazienti eleggibili per trapianto di cellule staminali ematopoietiche, per i quali un donatore sia stato identificato o sia attivamente cercato. La ERT è utilizzata per migliorare le condizioni generali del paziente prima del trapianto.

3B. Pazienti che sviluppano una riduzione progressiva del chimerismo, o rigetto, dopo un primo trapianto di cellule staminali con livelli bassi di iduronidasi endogena, e che attendono un secondo trapianto essendo ancora eleggibili per tale procedura.

3C. Per i pazienti con $QI \leq 70$ non ci sono indicazioni mediche al trattamento. Tuttavia i pazienti di questo gruppo che rispondono ai criteri di inclusione 1 e non ai criteri di esclusione 4, potrebbero essere considerati per la ERT in presenza di forte motivazione da parte delle famiglie: in tal caso le famiglie devono ricevere dettagliate informazioni riguardo l'efficacia, la sicurezza dell'ERT (incluso la possibile insorgenza di effetti collaterali), il protocollo di follow-up (frequenza delle infusioni e procedure di valutazione clinico-strumentali), e devono essere chiaramente consapevoli che la ERT non è efficace nel trattamento dei sintomi neurologici.

CRITERI DI ESCLUSIONE (4)

4A. Pazienti in gravidanza o allattamento che, una volta informate, non accettino il rischio remoto di danno per il feto o il lattante.

4B. Pazienti ritenuti troppo compromessi

4C. Presenza di un'altra malattia rischiosa per la vita, diversa dall'MPSI, la cui prognosi possa essere difficilmente modificata dalla ERT.

4D. I pazienti o i genitori che non accettino di firmare un consenso informato (un "contratto") per aderire ai criteri di inclusione, esclusione ed uscita dalla terapia e alla richiesta di compliance al trattamento e follow-up.

CRITERI DI USCITA (5)

5A. Il trattamento dovrebbe essere interrotto se il paziente sviluppa una complicanza che minaccia la vita che difficilmente possa beneficiare della ERT, incluso severe reazioni associate alle infusioni non controllate da cortisonici o riduzione della velocità di infusione.

5B. Mancata compliance del paziente al regime terapeutico raccomandato o alle visite di follow-up clinico-strumentale.

5C. Evidenza di progressione di malattia, nonostante regolare terapia, indicata da:

- Una riduzione di almeno il 10% del valore percentuale della capacità vitale forzata rispetto al valore predetto
- Una riduzione di almeno il 10% della frazione di eiezione
- Una riduzione di almeno il 10% della distanza percorsa al 6MWT

in assenza di complicanze specifiche di malattia suscettibili di terapia chirurgica, come lesione valvolare cardiaca o mielopatia cervicale.

Nota: il valore del 10% è arbitrario e suscettibile di revisione, in quanto non esistono dati specifici al riguardo.

L'evidenza di progressione di malattia dovrebbe essere confermata almeno due volte in un periodo di 6 mesi.

RACCOMANDAZIONI PER MUCOPOLISACCARIDOSI DI TIPO II (M. DI HUNTER)

INTRODUZIONE

La mucopolisaccaridosi di tipo II (MPS II) o malattia di Hunter è una malattia da accumulo lisosomiale, causata dal deficit di iduronato-2-solfatasi (IDS), che determina l'accumulo nei lisosomi di differenti tessuti di mucopolisaccaridi, principalmente il dermatan solfato e l'eparan solfato. L'eredità è di tipo recessivo, legata al cromosoma X. E' stata riportata un'incidenza variabile tra 1:34,000 e 1:165,000 nati maschi in differenti popolazioni (Shaap e Bach, 1980; Nelson et al, 2003). Tradizionalmente vengono distinte due forme cliniche: una forma severa, con ritardo mentale progressivo e prognosi infausta, ed una lieve, con possibile sopravvivenza sino all'età adulta e assenza di coinvolgimento neurologico. Tuttavia la malattia è caratterizzata da un ampio spettro fenotipico (Neufeld , 2001).

L'ampia variabilità del fenotipo riflette probabilmente un'ampia variabilità genetica. Infatti sono state descritte oltre 300 mutazioni differenti (Human Gene Mutation Database, 2006), ed è stato riportato che pazienti con mutazioni severe (delezioni complete del gene IDS e grossi riarrangiamenti) presentano un quadro clinico grave (Hopwood et al, 1993; Froissart 1998). L'ampia eterogeneità genetica rende tuttavia difficile una chiara correlazione genotipo-fenotipo (Filocamo et al, 2001).

Terapia: Per la mucopolisaccaridosi di tipo II sono attualmente disponibili solo terapie di supporto. Infatti, a differenza della mucopolisaccaridosi di tipo I, il trapianto di midollo non è al momento raccomandato per il trattamento dei pazienti affetti, poiché è associato ad un'elevata mortalità e non sembra prevenire i sintomi neurologici (Vellodi et al 1999). Sono stati pubblicati i risultati di un trial per valutare l'efficacia e la sicurezza della terapia enzimatica sostitutiva con iduronato-2-solfatasi ricombinante, i cui risultati sembrano incoraggianti (Muenzer et la, 2006; Muenzer et al 2007). Il trattamento con idursulfase è attualmente approvato e autorizzato al commercio negli Stati Uniti per l'indicazione MPS II. L'accesso al trattamento è consentito anche in Italia sulle spese del SSN.

QUADRO CLINICO

Il quadro clinico è caratterizzato dalla progressiva evoluzione di sintomi e segni, di seguito elencati, che dipendono dall'accumulo di glicosaminoglicani in vari tessuti e organi (OMIM +309900; Neufeld et al, 2001)

CRESCITA:

bassa statura, con altezza finale tra 120 e 150 cm

TESTA E COLLO:

Macrocefalia e scafocefalia

“Coarse facies” e collo corto

Macroglossia

Apparato dentario: gengiviti, carie, cisti, ascessi, alterazioni della crescita e morfologia dentaria

OCCHIO:

Papilledema
Degenerazione retinica
Ptosi

APPARATO OTORINO-LARINGOIATRICO:

riniti croniche e secrezioni abbondanti
otiti ricorrenti e sordità
ipertrofia adeno-tonsillare, restringimento tracheale e ispessimento delle corde vocali
sleep-apnea syndrome

APPARATO RESPIRATORIO:

Infezioni ricorrenti
Patologia polmonare restrittiva
Tracheobroncomalacia
Asma

CUORE:

Valvulopatia da accumulo
Cardiomiopatia
Cardiopatia ischemica
Ipertensione polmonare e sistemica
Insufficienza cardiaca

ADDOME:

Ernie ombelicale ed inguinale
Epato-splenomegalia
Sintomi gastrointestinali: diarrea, stipsi, dolori addominali

APPARATO MUSCOLO-SCHELETRICO:

disostosi multipla
rigidità e contratture articolari
cifoscoliosi e gibbo
mani ad artiglio, sindrome del tunnel carpale

SISTEMA NERVOSO CENTRALE:

Regressione psicomotoria fino a un grave ritardo mentale, oppure assenza di coinvolgimento del SNC nel fenotipo IIB
Idrocefalo
Mielopatia cervicale
Convulsioni

COMPLICANZE VARIE:

Aumentato rischio anestesilogico

DIAGNOSI

La **diagnosi** è sospettata sulla base del quadro clinico e dell'identificazione di elevati livelli di dermatan-solfato ed eparan-solfato nelle urine. La diagnosi definitiva è confermata dal ***dosaggio enzimatico*** della IDS in fibroblasti cutanei in coltura, leucociti o siero (Voznyi et al , 2001). La

caratterizzazione molecolare dei pazienti permette *il riconoscimento delle femmine portatrici* nelle rispettive famiglie a rischio e può facilitare la diagnosi prenatale (Filocamo et al, 2001).

La **diagnosi prenatale** si effettua su feti con accertato cariotipo maschile mediante dosaggio enzimatico della IDS su villi coriali freschi o amniociti coltivati. Nelle famiglie in cui è noto il genotipo del caso indice, la combinazione di analisi enzimatica e molecolare aumenta l'affidabilità dei risultati. In ogni caso si raccomanda che la diagnosi prenatale venga praticata in laboratori specializzati con riconosciuta esperienza (Keulemans et al, 2002).

RACCOMANDAZIONI PER LA GESTIONE DEL PAZIENTE AFFETTO DA MPS II

La gestione del paziente affetto da MPS II, in attesa dello sviluppo di terapie specifiche, è basata principalmente su terapie di supporto e trattamento precoce delle complicanze. La natura progressiva dei sintomi determina la necessità di un monitoraggio periodico (Wraith, 1995)

COINVOLGIMENTO NEUROLOGICO

Sviluppo cognitivo

Valutazioni periodiche:	test di livello (Griffith's mental scale, test di Baley, Wechsler-Bellevue scale (WIPPSI, WISC-R, WAISS)
Terapia di supporto:	supporto psicologico, psicomotricità, logopedia

I pazienti affetti da MPS II presentano un variabile coinvolgimento del SNC, con sviluppo intellettivo normale o ritardato. Il linguaggio può essere compromesso a causa dello sviluppo di ipoacusia, oltre che della macroglossia. Difficoltà di apprendimento e problemi comportamentali sono spesso riportati (Bax e Coville, 1995)

Pertanto sono utili valutazioni periodiche del livello di sviluppo psico-motorio, controlli audiologici e otorino, con una stretta collaborazione tra i vari specialisti (Hayes et al, 1980; Peck, 1984). Le terapie di supporto e riabilitative (protesi acustiche, logopedia, supporto psicologico) vanno iniziate precocemente.

Sistema nervoso centrale

Complicanze:	Idrocefalo Mielopatia cervicale
Valutazioni periodiche:	Esame neurologico RMN encefalo e rachide cervicale Radiografia del rachide cervicale in flessione ed estensione Potenziali evocati somatosensoriali Cisternografia lombare (nel sospetto di idrocefalo)
Terapia di supporto:	Shunt ventricolo-peritoneale se necessario Decompressione spinale chirurgica se necessario

I pazienti affetti da MPS II possono presentare complicanze neurologiche legate allo sviluppo di idrocefalo (Yatziv and Epstein, 1977) o mielopatia cervicale (Kachur e Del Maestro, 2000). Il monitoraggio periodico con valutazioni neurologiche, ed i potenziali evocati somatosensoriali (SEP) agli arti superiori sono pertanto necessari nel corso del follow-up. Sulla base delle valutazioni

cliniche ed elettrofisiologiche, si può valutare l'esecuzione di RMN di encefalo e rachide cervicale, quando possibile in condizioni di sicurezza.

La valutazione dei ventricoli mediante RMN dimostra un aumento del volume che può dipendere dalla atrofia cerebrale e da un difetto nel riassorbimento del fluido cerebrospinale (CSF). La presenza di idrocefalo comunicante è riportata in pazienti con fenotipo severo e può essere dimostrata dalla RMN o, in casi selezionati, dalla cisternografia lombare. Il posizionamento di uno shunt ventricolo-peritoneale è indicata in pazienti con aumentata pressione del CSF e progressivo aumento del volume ventricolare (Van Aerde e Campbell, 1983; Neufeld et al, 2001).

La mielopatia cervicale è causata dalla stenosi del forame occipitale e del canale spinale cervicale, oltre che dalla sub-lussazione atlanto-assiale e ispessimento delle meningi.

La presenza di sintomi e segni neurologici (debolezza degli arti inferiori, andatura anomala, iperreflessia, spasticità, alterazione della sensibilità) va pertanto attentamente monitorata.

I potenziali evocati somatosensoriali possono permettere di individuare precocemente la compressione spinale (Boor, 2000).

Oltre alla RMN, una radiografia del rachide cervicale in flessione ed estensione, può essere utile per valutare l'instabilità atlanto-assiale, anche se tali indagini, in presenza di una compressione midollare, possono presentare margini di rischio. In alternativa, la TAC senza estensione o flessione può dare buone informazioni sulla instabilità atlanto-occipitale.

Il trattamento della compressione spinale è basato sulla decompressione con dura-plastica, laminectomia e craniotomia occipitale. In caso di instabilità atlanto-assiale è necessaria anche la fusione di C1-C2. La presenza di una compressione spinale o di una instabilità vertebrale va riconosciuta precocemente (specialmente nei pazienti con fenotipo lieve), poiché è associata ad elevata mortalità e morbidità con danno neurologico irreversibile. Pertanto i rischi/benefici di un trattamento chirurgico precoce vanno attentamente valutati (Vinchon et al, 1995; O'Brien et al, 1997).

SISTEMA VISIVO

Valutazioni periodiche:

Visita oculistica completa di misura della pressione oculare e valutazione fondo oculare

I pazienti affetti da MPS II presentano problemi oculistici con ispessimento della sclera, papilledema e degenerazione retinica (Vine, 1986; Beck e Cole, 1984; McDonnell et al, 1985; Caruso et al, 1986). Pertanto dovrebbero essere sottoposti ad una valutazione oculistica periodica, completa di misura valutazione del fondo oculare e della pressione oculare, oltre che di un ERG. Va segnalato tuttavia che la misura della pressione oculare non è possibile senza anestesia nei piccoli ed i quelli con ritardo mentale, e dunque in tali pazienti va valutato attentamente il rapporto costo-beneficio di tale indagine.

PROBLEMATICHE OTORINOLARINGOIATRICHE, IPOACUSIA, OSTRUZIONE DELLE VIE AEREE

Complicanze:	Sordità, Sleep-apnea syndrome
Valutazioni periodiche:	Visita ORL, audiometria Polisonnografia
Terapia di supporto:	Miringotomia Protesi acustiche Adeno-tonsillectomia n-CPAP Ossigenoterapia

I pazienti affetti da MPS II presentano riniti croniche, secrezioni abbondanti, sinusite, otiti ricorrenti. Possono presentare sordità (di conduzione e neurosensoriale) a causa di complicanze legate ad otiti ricorrenti e a danno nel nervo acustico (Peck, 1984). Pertanto è utile effettuare frequentemente un monitoraggio periodico con controlli otorino e audiologici.

L'ostruzione delle vie aeree superiori, legata alla macroglossia, all'ipertrofia di adenoidi e tonsille, al restringimento della trachea e ad un ispessimento delle corde vocali, provoca sintomi quali russamento, apnee notturne, sonnolenza diurna e difficoltà respiratorie con ipossia (sleep apnea syndrome) (Brama et al, 1986; Sasaki et al, 1987). Tale complicanza rappresenta uno dei maggiori problemi di gestione in molti bambini (Shapiro et al, 1985).

La polisonnografia, per la valutazione delle apnee ostruttive, andrebbe praticata periodicamente.

Le terapie di supporto devono essere intraprese precocemente: la miringotomia può facilitare il drenaggio del muco a livello dell'orecchio medio. Le protesi acustiche migliorano l'interazione sociale del paziente (Motamed et al, 2000).

Nel caso di russamento e apnee notturne l'adenoidectomia e la tonsillectomia sono considerati interventi elettivi la cui indicazione va attentamente valutata in considerazione del rischio anestesilogico (Adachi e Chole, 1990; Ruckenstein et al, 1991). Il trattamento laser delle lesioni tracheali è stato utilizzato in alcuni pazienti (Lin et al, 2000).

In presenza di forme gravi di ostruzione delle vie aeree è indicato il trattamento con n-CPAP e la supplementazione di ossigeno (Ginzburg et al, 1990). Nelle forme più gravi è necessaria la tracheotomia.

APPARATO RESPIRATORIO

Complicanze:	patologia polmonare restrittiva e ostruttiva, infezioni
Valutazioni periodiche:	Visita pneumologica Spirometria
Terapia di supporto:	Broncodilatatori Antibiotici Fisioterapia respiratoria

I pazienti affetti da MPS II presentano anche un coinvolgimento delle vie aeree inferiori, di tipo sia restrittivo che ostruttivo con asma. Infezioni respiratorie ricorrenti possono complicare acutamente il quadro clinico (Semenza e Pyeritz, 1988).

La valutazione pneumologica periodica, e la spirometria nei pazienti collaboranti, sono raccomandate.

Farmaci contro l'asma e trattamenti antibiotici, possibilmente mirati, potranno essere somministrati secondo le esigenze. Una fisioterapia respiratoria può essere utile per migliorare la funzione respiratoria e ridurre il ristagno delle secrezioni.

SISTEMA CARDIOVASCOLARE

Valutazioni periodiche:	Visita cardiologia + misura della pressione arteriosa ECG Ecocardio-colordoppler
Terapia di supporto:	profilassi antibiotica dell'endocardite batterica

I pazienti affetti da MPS II presentano una cardiopatia da accumulo, con complicanze che coinvolgono il sistema valvolare, cardiomiopatia, insufficienza cardiaca, alterazioni coronariche, cuore polmonare, ipertensione polmonare e sistemica.

Considerata l'evoluzione progressiva del coinvolgimento cardiologico, tutti i pazienti con MPS II dovrebbero ricevere un controllo cardiologico periodico con ECG ed ecocardiocolordoppler. Un'appropriata profilassi antibiotica dell'endocardite batterica è raccomandata prima di interventi chirurgici, compresi gli interventi odontoiatrici (Neufeld et al, 2001).

APPARATO MUSCOLO-SCHELETRICO

Complicanze:	Disostosi multipla Sindrome del tunnel carpale
Valutazioni periodiche:	Visita ortopedica Velocità di conduzione del nervo mediano Elettromiografia Valutazione fisiatica, misura dell'apertura degli angoli articolari Test del cammino dei 6 minuti
Terapia di supporto:	Eventuale decompressione chirurgica del tunnel carpale Fisioterapia

I pazienti affetti da MPS II presentano un progressivo interessamento articolare e scheletrico, che può causare una grave limitazione funzionale fino alla perdita completa dell'attività motoria. Il coinvolgimento scheletrico è caratterizzato da deformità della colonna vertebrale con cifosi, scoliosi, cifoscoliosi e gibbo, da difetto di ossificazione, (disostosi multipla), displasia e sublussazione delle anche, valgismi, varismi ossei, deformità metafisarie e contratture articolari. La disostosi falangea e l'ispessimento della sinovia determinano le caratteristiche mani ad artigiano.

La motilità della mano può essere ulteriormente complicata dallo sviluppo di una sindrome del tunnel carpale. Questa complicanza è molto frequente, ma la maggior parte dei pazienti non riferisce sintomi (dolore, parestesie), fino a che la compressione del nervo non è molto severa. Perciò la valutazione ortopedica, la misura della velocità di conduzione del nervo mediano e l'elettromiografia sono raccomandati per riconoscere precocemente una sindrome del tunnel

carpale. Infatti la decompressione chirurgica del nervo mediano, ed eventualmente, la recisione del tendine flessorio in alcuni pazienti valutati per la presenza di dito a scatto, possono migliorare la funzione motoria della mano, soprattutto se l'intervento chirurgico è praticato precocemente, prima di un severo danno del nervo (Pronicka et al, 1988; Van Heest et al, 1998).

La valutazione fisiatrice è richiesta per valutare il grado di restrizione articolare, mediante misure standardizzate della mobilità articolare, a livello di più articolazioni (Clarkson e Gilewich, 1989; Norkin e White, 1985). Ciò appare utile anche per valutare l'efficacia della terapia sostitutiva sulla funzione motoria (Kakkis et al, 2001; Harmatz et al, 2005; Wraith, 2005). Infine, la funzione motoria complessiva e la resistenza allo sforzo fisico dovrebbero essere valutate periodicamente con il test del cammino dei 6 minuti in tutti i pazienti collaboranti (Enright, 2003).

La valutazione fisiatrice è inoltre richiesta per stabilire precocemente gli interventi riabilitativi (per esempio ginnastica passiva, esercizi volontari, idroterapia etc...) atti a mantenere la funzione motoria e il tono muscolare (Neufeld et al, 2001).

ERNIE E APPARATO GASTROINTESTINALE

<i>Valutazioni periodiche:</i>	Ecografia addominale Valutazione clinica ed ecografia delle ernie RMN o TC per volume fegato e milza per pazienti in ERT
<i>Terapia di supporto:</i>	Correzione chirurgica delle ernie, se indicata Lassativi e/o diete per i disturbi dell'alvo

I pazienti con MPS II presentano un'aumentata frequenza di ernie inguinali e ombelicali a causa di una lassità del tessuto connettivo, aggravata dalla presenza di epatosplenomegalia severa. Il volume delle ernie deve pertanto essere monitorato clinicamente ed ecograficamente e la necessità di correzione chirurgica, in particolare delle ernie inguinali, deve essere periodicamente valutata.

La valutazione del volume di fegato e milza con metodiche RMN o TC è utile in pazienti che praticano il trattamento enzimatico sostitutivo, per valutare l'efficacia della terapia.

Sintomi gastrointestinali, quali diarrea e stipsi possono essere controllati dall'uso di diete appropriate o lassativi.

APPARATO DENTARIO

I pazienti affetti da MPS II presentano gengiviti, carie, alterazioni della crescita e morfologia dentale. Pertanto controlli odontoiatrici periodici e un'accurata igiene dentaria sono raccomandati.

La necessità di procedure odontoiatriche che richiedano anestesia generale va attentamente valutata, in considerazione degli aumentati rischi.

PROCEDURE ANESTESIOLOGICHE

Valutazione anestesiologicala pre-operatoria (incluso Rx rachide cervicale e tessuti molli del collo)
Anestesia locale o regionale da preferire quando possibile
Intubazione preferibilmente con fibroscopio e cannule di calibro ridotto, evitando l'iperestensione del collo
Disponibilità di terapia intensiva
Monitoraggio post-operatorio intensivo

I pazienti affetti da MPS II presentano un altissimo rischio anestesilogico per l'ostruzione delle vie aeree superiori, con difficoltà di intubazione, potenzialmente fatale. Tale rischio aumenta proporzionalmente all'età del paziente. I pazienti che debbano essere sottoposti ad anestesia generale devono essere trattati in centri con provata esperienza ed in grado di fronteggiare emergenze rianimatorie.

L'anestesia locale o regionale è preferita anche quando l'età e lo stato mentale del paziente costituiscono relative controindicazioni. In caso di anestesia generale si raccomanda di mantenere la respirazione spontanea fino a quando il paziente non sia stato intubato, considerate le possibili difficoltà di intubazione. (Sjogren et al, 1987). Infatti, l'accumulo di GAG nelle vie aeree limita la possibilità di visualizzare il laringe con il laringoscopia e riduce il diametro tracheale; pertanto l'intubazione dovrebbe essere effettuata preferibilmente con il fibroscopio, utilizzando cannule endotracheali di diametro ridotto rispetto a quello che sarebbe richiesto dall'età del paziente (Walzer, 1997; Walzer, 2000). Inoltre l'instabilità spinale richiede particolare attenzione nelle manovre di iperestensione del collo.

Un'attenta valutazione pre-operatoria, che comprenda una valutazione con tecniche non invasive della sub-lussazione atlanto-assiale e del diametro del laringe (Rx del rachide cervicale e dei tessuti molli del collo) è utile nei pazienti che devono ricevere un'anestesia generale.

Infine sono state descritte complicanze post-operatorie legate all'ostruzione delle vie aeree, ritardato risveglio dall'anestesia e edema polmonare. Si raccomanda pertanto, successivamente all'anestesia generale, un monitoraggio intensivo del paziente affetto da MPS II ed il trattamento di infezioni polmonari concomitanti e del ristagno di secrezioni.

TERAPIA ENZIMATICA SOSTITUTIVA

E' attualmente in commercio una terapia enzimatica sostitutiva (ERT) con:

- idursulfase ricombinante umana

Ad oggi sono stati pubblicati i trial di fase I/II e II/III relativi a tale trattamento (Muenzer J et al, 2006, Muenzer J et al 2007).

Efficacia.

Tali studi hanno dimostrato che la somministrazione settimanale di 0,5 mg/kg di idursulfase migliora la distanza percorsa in 6 minuti (6MWT) e la capacità vitale forzata, oltre che alcuni parametri scelti come outcome secondari, quali le dimensioni di fegato e milza, i livelli di GAG urinari. Un miglioramento della mobilità articolare è stato osservato esclusivamente a livello dell'articolazione del gomito (Muenzer J et al, 2006).

Sicurezza.

I pazienti sottoposti ad ERT devono essere strettamente monitorati per la possibile insorgenza di reazioni avverse. Si possono avere reazioni durante l'infusione o nelle ore successive, tra cui febbre e reazioni di tipo anafilattico.

I pazienti in trattamento devono attenersi strettamente a protocolli di somministrazione, monitorando i parametri vitali (frequenza cardiaca, frequenza respiratoria, pressione arteriosa e temperatura corporea) durante le infusioni.

Circa la metà dei pazienti in ERT durante il trial di fase I/II sviluppano anticorpi di tipo IgG-anti-idursulfase. La presenza di anticorpi non sembra influenzare l'efficacia terapeutica.

Non sembra sino ad oggi che tale risposta immunitaria sia correlata con un'aumentata frequenza di eventi avversi.

Indicazioni.

In Italia è stato di recente approvato dall'AIFA l'uso del farmaco idursulfase (Elaprase ® prodotto dalla ditta Shire) per il trattamento della mucopolisaccaridosi II in tutti i pazienti con diagnosi confermata. Il dosaggio raccomandato è di: 0,5mg/Kg di peso corporeo/ogni settimana.

MONITORAGGIO

Per i pazienti affetti da MPSII, sia in trattamento enzimatico sostitutivo, sia non trattati, si raccomanda un monitoraggio periodico, come sintetizzato nella tabella 1.

I test praticati alla baseline saranno ripetuti più frequentemente se clinicamente indicato.

I pazienti arruolati nel trial sperimentale saranno valutati secondo le procedure previste nel protocollo, eventualmente integrate secondo le raccomandazioni della tabella 1.

Tabella 1: valutazioni raccomandate in pazienti con MPS I in ERT, o candidati alla ERT.

(Per i pazienti non candidati alla ERT la frequenza delle valutazioni può essere ridotta e stabilita sulla base delle indicazioni cliniche)

	Valutazione basale	Ogni 6 mesi	Ogni anno	Ogni 2 anni
Anamnesi				
▪ Dosaggio enzimatico	x			
▪ Analisi molecolare	x			
▪ Età alla diagnosi	x			
Esame fisico generale e parametri vitali (compreso PA)*	x	x		
Parametri auxologici (Peso, Alt., Circ. Cranica)	x	x		
Routine ematochimica ed esame urine	x	x		
Valutazione neurologica				
▪ Esame neurologico	x		x	
▪ Test psicometrici	x		x	
▪ Potenziali evocati somatosensoriali (SEP)	x		x	
▪ RMN encefalo, rachide, TC cranio e/o giunzione atlanto-occipitale **	x			x
Valutazione oculistica (Acuità visiva, pressione oculare, fondo oculare)	x		x	
Valutazione ORL				
▪ Audiometria, visita ORL	x		x	
Valutazione respiratoria				
▪ FCV/FEV1	x	x		
▪ Polisonnografia	x		x	
Valutazione cardiologica				
▪ ECG	x	x		
▪ Ecocardio-colordoppler	x	x		
Apparato locomotore				
▪ Visita fisiatrica e mobilità articolare***	x	x		
▪ Test del cammino dei 6 minuti	x	x		
▪ Visita ortopedica	x		x	
▪ Rx scheletro	x			x [°]
▪ EMG/Velocità conduzione nervo mediano	x			x
GAG urinari	x	x		
Volume fegato e milza (RMN), in alternativa diametro long. lobo epatico dx e diametro long splenico (ecografia)	x	x ^{°°}		

*L'esame clinico, comprensivo della misurazione dei parametri vitali, va praticato anche ad ogni infusione.

**** la RMN encefalo + rachide dovrebbe essere praticata al baseline; nel corso del follow-up si può valutare la ripetizione dell'esame RMN o, in alternativa, della TC del cranio e/o giunzione atlanto-occipitale, sulla base dei risultati delle valutazioni neurologiche e dei SEP, e di una valutazione della sicurezza di tali indagini basata sulle condizioni generali del paziente**

*** la misura della mobilità articolare passiva, mediante goniometria standard, dovrebbe essere effettuata da un fisioterapista esperto, registrando l'apertura degli angoli articolari a livello di spalla, gomito, polso, 2° dito, anca e ginocchio, caviglia bilateralmente.

° E' possibile praticare Rx di signoli segmenti scheletrici (al posto dell'Rx scheletro in toto) sulla base delle indicazioni cliniche.

°° Per i pazienti non in trattamento o in terapia ma in condizioni stabilizzate, il volume degli organi ipocondriaci può essere valutato con cadenza annuale.

REFERENZE

- Adachi K, Chole RA. Management of tracheal lesions in Hurler syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1990 Oct;116(10):1205-7.
- Bax MC, Colville GA. Behaviour in mucopolysaccharide disorders. *Arch Dis Child*. 1995;73(1):77-81
- Beck M, Cole G. Disc oedema in association with Hunter's syndrome: ocular histopathological findings. *Br J Ophthalmol*. 1984 Aug;68(8):590-4
- Boor R, Miebach E, Bruhl K, Beck M. Abnormal somatosensory evoked potentials indicate compressive cervical myelopathy in mucopolysaccharidoses. *Neuropediatrics*. 2000;31(3):122-7
- Brama I, Gay I, Feinmesser R, Springer C. Upper airway obstruction in Hunter syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1986 Sep;11(3):229-35.
- Caruso RC, Kaiser-Kupfer MI, Muenzer J, Ludwig IH, Zasloff MA, Mercer PA. Electroretinographic findings in the mucopolysaccharidoses. *Ophthalmology*. 1986 Dec;93(12):1612-6.
- Clarkson, H. M., and Gilewich, G. B., 1989 *Musculoskeletal Assessment: Joint Range of Motion and Manual Muscle Strength*, London: Williams & Wilkins
- Enright PL. The six-minute walk test. *Respir Care*. 2003;48(8):783-5.
- Filocamo M, Bonuccelli G, Corsolini F, Mazzotti R, Cusano R, Gatti R. Molecular analysis of 40 Italian patients with mucopolysaccharidosis type II: New mutations in the iduronate-2-sulfatase (IDS) gene. *Hum Mutat*. 2001;18(2):164-5
- Froissart R, Maire I, Millat G, Cudry S, Birot AM, Bonnet V, Bouton O, Bozon D. Identification of iduronate sulfatase gene alterations in 70 unrelated Hunter patients. *Clin Genet*. 1998 May;53(5):362-8.
- Ginzburg AS, Onal E, Aronson RM, Schild JA, Mafee MF, Lopata M. Successful use of nasal-CPAP for obstructive sleep apnea in Hunter syndrome with diffuse airway involvement. *Chest*. 1990;97(6):1496-8.
- Harmatz P, Ketteridge D, Giugliani R, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Yu ZF, Swiedler SJ, Hopwood JJ; MPS VI Study Group. Direct comparison of measures of endurance, mobility, and joint function during enzyme-replacement therapy of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): results after 48 weeks in a phase 2 open-label clinical study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Pediatrics*. 2005;115(6):e681-9.
- Hayes E, Babin R, Platz C. The otologic manifestations of mucopolysaccharidoses. *Am J Otol*. 1980;2(2):65-9
- Hopwood JJ, Bunge S, Morris CP, Wilson PJ, Steglich C, Beck M, Schwinger E, Gal A. Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate-2-sulphatase gene. *Hum Mutat*. 1993;2(6):435-42.

Human Gene Mutation Database (HGMD), Cardiff, UK. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

Kachur E, Del Maestro R. Mucopolysaccharidoses and spinal cord compression: case report and review of the literature with implications of bone marrow transplantation .Neurosurgery. 2000;47(1):223-9

Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, Izykowski B, Phillips J, Doroshov R, Walot I, Hoft R, Neufeld EF. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. N Engl J Med. 2001;344(3):182-8.

Keulemans JL, Sinigerska I, Garritsen VH, Huijmans JG, Voznyi YV, van Diggelen OP, Kleijer WJ. Prenatal diagnosis of the Hunter syndrome and the introduction of a new fluorimetric enzyme assay. Prenat Diagn. 2002 Nov;22(11):1016-21.

Lin CM, Hsu JC, Liu HP, Li HY, Tan PP. Anesthesia of CO2 laser surgery in a patient with Hunter syndrome: case report. Chang Gung Med J. 2000;23(10):614-8.

McDonnell JM, Green WR, Maumenee IH. Ocular histopathology of systemic mucopolysaccharidosis, type II-A (Hunter syndrome, severe).

Motamed M, Thorne S, Narula A. Treatment of otitis media with effusion in children with mucopolysaccharidoses. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2000 Jun 30;53(2):121-4

Muenzer J, Wraith JE, Beck Met al. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). Genet Med. 2006 Aug;8(8):465-73).

Muenzer J, Gucsavas-Calikoglu M, McCandless SE, Schuetz TJ, Kimura A. A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). Mol Genet Metab. 2007 Mar;90(3):329-37

Nelson J, Crowhurst J, Carey B, Greed L. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia. Am J Med Genet A. 2003 Dec 15;123(3):310-3

Neufeld E.F. and Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th Edition (2001). C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly and D. Valle (eds9, McGraw-Hill (New York), pp 3421-3452

Norkin, C.C., and White, D. J., 1985 Measurement of Joint Motion: A Guide to Goniometry, Philadelphia, PA: F.A. Davis Co.

O'Brien DP, Cowie RA, Wraith JE. Cervical decompression in mild mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). Childs Nerv Syst. 1997;13(2):87-90

Peck JE. Hearing loss in Hunter's syndrome--mucopolysaccharidosis II. Ear Hear. 1984;5(4):243-6

Pronicka E, Tylki-Szymanska A, Kwast O, Chmielik J, Maciejko D, Cedro A. Carpal tunnel syndrome in children with mucopolysaccharidoses: needs for surgical tendons and median nerve release. J Ment Defic Res. 1988;32 (Pt 1):79-82.

- Ruckenstein MJ, Macdonald RE, Clarke JT, Forte V. The management of otolaryngological problems in the mucopolysaccharidoses: a retrospective review. *J Otolaryngol*. 1991 Jun;20(3):177-83.
- Sasaki CT, Ruiz R, Gaito R Jr, Kirchner JA, Seshi B. Hunter's syndrome: a study in airway obstruction. *Laryngoscope*. 1987 Mar;97(3 Pt 1):280-5.
- Schaap T, Bach G. Incidence of mucopolysaccharidoses in Israel: is Hunter disease a "Jewish disease"? *Hum Genet*. 1980;56(2):221-3.
- Semenza GL, Pyeritz RE. Respiratory complications of mucopolysaccharide storage disorders. *Medicine (Baltimore)*. 1988 Jul;67(4):209-19.
- Shapiro J, Strome M, Crocker AC. Airway obstruction and sleep apnea in Hurler and Hunter syndromes. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1985 Sep-Oct;94(5 Pt 1):458-61.
- Sjogren P, Pedersen T, Steinmetz H. Mucopolysaccharidoses and anaesthetic risks. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1987;31(3):214-8.
- Van Aerde J, Campbell A. Hydrocephalus and shunt placement. *Am J Dis Child*. 1983;137(2):187-8.
- Van Heest AE, House J, Krivit W, Walker K. Surgical treatment of carpal tunnel syndrome and trigger digits in children with mucopolysaccharide storage disorders. *J Hand Surg [Am]*. 1998 Mar;23(2):236-43.
- Vinchon M, Cotten A, Clarisse J, Chiki R, Christiaens JL. Cervical myelopathy secondary to Hunter syndrome in an adult. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1995;16(7):1402-3.
- Vine AK. Uveal effusion in Hunter's syndrome. Evidence that abnormal sclera is responsible for the uveal effusion syndrome. *Retina*. 1986 Winter-Spring;6(1):57-60.
- Voznyi YV, Keulemans JL, van Diggelen OP. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of MPS II (Hunter disease). *J Inherit Metab Dis*. 2001 Nov;24(6):675-80.
- Wraith JE. The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management. *Arch Dis Child*. 1995;72(3):263-7.
- Wraith JE. The first 5 years of clinical experience with laronidase enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I. *Expert Opin Pharmacother*. 2005;6(3):489-506. Review.
- Yatziv S, Epstein CJ. Hunter syndrome presenting as macrocephaly and hydrocephalus. *J Med Genet*. 1977;14(6):445-7.

MUCOPOLISACCARIDOSI DI TIPO II (MPSII)

RACCOMANDAZIONI PER LA TERAPIA ENZIMATICA SOSTITUTIVA (ERT): CRITERI DI INCLUSIONE, ESCLUSIONE ED USCITA.

PREMESSA

Per essere valutati per il trattamento, i pazienti o i tutori legali devono firmare un consenso informato (un “contratto”) per accettare i criteri di inclusione, esclusione ed uscita dalla terapia e la richiesta di compliance al trattamento e al follow-up.

CRITERI DI INCLUSIONE (1-3)

2. Dovrebbero essere considerati per il trattamento immediato i pazienti con MPSII senza interessamento neurologico o con lieve interessamento neurologico, con almeno uno tra i seguenti segni o sintomi:

1A. Segni di ostruzione delle vie aeree superiori, come sindrome delle apnee ostruttive del sonno, diagnosticate mediante polisonnografia, e definite come indice apnea/ipoapnea >5 negli adulti o >1 nei bambini, o saturazione di ossigeno notturna $<85\%$ negli adulti o $<92\%$ nei bambini. **Nota:** l'indice apnea/ipoapnea è il numero medio di apnee o ipopnee per ora di sonno.

1B. Storia di difficoltà d'intubazione; uso di pressione positiva continua (CPAP) o BiPAP, che indicherebbero una significativa ostruzione delle vie aeree superiori.

1C. Coinvolgimento respiratorio sintomatico, o asintomatico, incluso insufficienza respiratoria restrittiva, quando confermato da test di funzionalità respiratoria che indichino una capacità vitale forzata $<80\%$ del predetto.

1D. Ipertrofia miocardica, definita da un valore di massa ventricolare sinistra indicizzata rispetto alla superficie corporea (LVMI) >103 g/m².

1E. Evidenza di ridotta resistenza allo sforzo definita mediante test del cammino dei 6 minuti (6MWT). Tale test è stato utilizzato in trial clinici di fase I/II e II/III, ma i valori normali dipendono dall'altezza e dalla lunghezza del passo e non esistono al momento valori di riferimento per i bambini. Attualmente quindi si considera funzionalmente importante per attività quali attraversare la strada o effettuare una commissione nel quartiere, una capacità di deambulazione indipendente in comunità ad una velocità normale di 80 metri/minuto per 332 metri. Quindi si suggerisce che una distanza percorsa al 6MWT di <300 metri debba essere considerata un'indicazione al trattamento.

1F. Pazienti con sintomi e segni suggestivi di aumentata pressione intracranica come cefalea ricorrente e papilledema.

2. I pazienti senza interessamento neurologico che non rispondono ai precedenti criteri dovrebbero essere valutati sistematicamente ogni 6 mesi per mettere in evidenza precocemente un'eventuale progressione della malattia e per rivalutare dunque nel tempo la loro inclusione in terapia con ERT. L'evidenza di progressione è stabilita per esempio da:

- Una riduzione di almeno il 10% del valore percentuale della capacità vitale forzata rispetto al predetto
- Un aumento di almeno il 10% del LVMI
- Una riduzione di almeno il 10% della distanza percorsa al 6MWT

in assenza di complicanze specifiche di malattia suscettibili di terapia chirurgica, come lesione valvolare cardiaca o mielopatia cervicale.

Nota: il valore del 10% è arbitrario e suscettibile di revisione, in quanto non esistono dati specifici al riguardo.

Questi pazienti possono essere considerati invece eleggibili di trattamento immediato soltanto in presenza di forte motivazione da parte dei pazienti e/o delle famiglie; dovrebbero in tal caso ricevere dettagliate informazioni riguardo l'efficacia, la sicurezza dell'ERT (incluso la possibile insorgenza di effetti collaterali), il protocollo di follow-up (frequenza delle infusioni e procedure di valutazione clinico-strumentali). Dovrebbero essere chiaramente coscienti della mancanza di una evidenza chiara che la ERT sia efficace nel prevenire l'insorgenza di problemi clinici correlati alla malattia sottostante sebbene, analogamente a quanto dimostrato per la Malattia di Gaucher, l'efficacia della ERT nel prevenire le manifestazioni cliniche non neurologiche sia molto probabile.

3. Per i pazienti con MPSII con coinvolgimento neurologico ($QI \leq 70$) non ci sono indicazioni mediche al trattamento. Tuttavia i pazienti di questo gruppo che rispondono ai criteri di inclusione 1 e non ai criteri di esclusione 4, potrebbero essere considerati per la ERT in presenza di forte motivazione da parte delle famiglie: in tal caso le famiglie devono ricevere dettagliate informazioni riguardo l'efficacia, la sicurezza dell'ERT (incluso la possibile insorgenza di effetti collaterali), il protocollo di follow-up (frequenza delle infusioni e procedure di valutazione clinico-strumentali), e devono essere chiaramente consapevoli che la ERT non è efficace nel trattamento dei sintomi neurologici.

CRITERI DI ESCLUSIONE (4)

4A. Rarissime pazienti di sesso femminile in gravidanza o allattamento che, una volta informate, non accettino il rischio remoto di danno per il feto o il lattante.

4B. Pazienti ritenuti troppo compromessi

4C. Presenza di un'altra malattia rischiosa per la vita, diversa dall'MPSII, la cui prognosi possa essere difficilmente modificata dalla ERT.

4D. I pazienti o i genitori che non accettino di firmare un consenso informato (un "contratto") per aderire ai criteri di inclusione, esclusione ed uscita dalla terapia e alla richiesta di compliance al trattamento e follow-up.

CRITERI DI USCITA (5)

5A. Il trattamento dovrebbe essere interrotto se il paziente sviluppa una complicanza che minaccia la vita che difficilmente possa beneficiare della ERT, incluso severe reazioni associate alle infusioni non controllate da cortisonici o riduzione della velocità di infusione.

5B. Mancata compliance del paziente al regime terapeutico raccomandato o alle visite di follow-up clinico-strumentale.

5C. Evidenza di progressione di malattia, nonostante regolare terapia, indicata da:

- Una riduzione di almeno il 10% del valore percentuale della capacità vitale forzata rispetto al valore predetto
- Un aumento di almeno il 10% del LVMI
- Una riduzione di almeno il 10% della distanza percorsa al 6MWT

in assenza di complicanze specifiche di malattia suscettibili di terapia chirurgica, come lesione valvolare cardiaca o mielopatia cervicale.

Nota: il valore del 10% è arbitrario e suscettibile di revisione, in quanto non esistono dati specifici al riguardo.

L'evidenza di progressione di malattia dovrebbe essere confermata almeno due volte in un periodo di 6 mesi.

Working Group: Fecarotta, Rossi, Auricchio, Barone, Scarpa

**RACCOMANDAZIONI PER IL MONITORAGGIO E TRATTAMENTO DI PAZIENTI
AFFETTI DA MUCOPOLISACCARIDOSI DI TIPO 6 (MPS VI)**

MONITORAGGIO

Per i pazienti affetti da MPSVI, sia in trattamento enzimatico sostitutivo, sia non trattati, si raccomanda un monitoraggio periodico, come sintetizzato nella tabella 1.

I test praticati alla baseline saranno ripetuti più frequentemente se clinicamente indicato.

I pazienti arruolati nel trial sperimentale saranno valutati secondo le procedure previste nel protocollo, eventualmente integrate secondo le raccomandazioni della tabella 1.

Tabella 1: valutazioni raccomandate in pazienti con MPS I in ERT, o candidati alla ERT.
(Per i pazienti non candidati alla ERT la frequenza delle valutazioni può essere ridotta e stabilita sulla base delle indicazioni cliniche)

	Valutazione basale	Ogni 6 mesi	Ogni 12 mesi	Ogni 2 anni
Anamnesi				
▪ Dosaggio enzimatico	x			
▪ Analisi molecolare	x			
▪ Età alla diagnosi	x			
Esame fisico generale e parametri vitali (compreso PA)*	x	x		
Parametri auxologici (Peso, Altezza, Circ cranica)	x	x		
Routine ematochimica ed esame urine	x	x		
Valutazione neurologica				
▪ Esame neurologico	x		x	
▪ Test psicometrici	x		x	
▪ Potenziali evocati somatosensoriali (SEP)	x		x	
▪ RMN encefalo, rachide, TC cranio e/o giunzione atlanto-occipitale **	x			x
Valutazione oculistica (Acuità visiva, pressione oculare, fondo oculare)	x		x	
Valutazione ORL				
▪ Audiometria, visita ORL	x		x	
Valutazione respiratoria				
▪ FCV/FEV1	x	x		
▪ Polisonnografia	x		x	
Valutazione cardiologica				
▪ ECG	x	x		
▪ Ecocardio-colordoppler	x	x		
Apparato locomotore				
▪ Visita fisiatrica e mobilità articolare***	x	x		
▪ Test del cammino dei 6 minuti	x	x		
▪ Visita ortopedica	x		x	
▪ Rx scheletro	x			x°
▪ EMG/Velocità conduzione nervo mediano	x			x
GAG urinari	x	x		
Volume fegato e milza (RMN), in alternativa diametro long. lobo epatico dx e diametro long splenico (ecografia)	x	x°°		

*L'esame clinico, comprensivo della misurazione dei parametri vitali, va praticato anche ad ogni infusione.

** la RMN encefalo + rachide dovrebbe essere praticata al baseline; nel corso del follow-up si può valutare la ripetizione dell'esame RMN o, in alternativa, della TC del cranio e/o giunzione atlanto-occipitale, sulla base dei risultati delle valutazioni neurologiche e dei SEP, e di una valutazione della sicurezza di tali indagini basata sulle condizioni generali del paziente

*** la misura della mobilità articolare passiva, mediante gonometria standard, dovrebbe essere effettuata da un fisioterapista esperto, registrando l'apertura degli angoli articolari a livello di spalla, gomito, polso, 2° dito, anca e ginocchio, caviglia bilateralmente.

° E' possibile praticare Rx di singoli segmenti scheletrici (al posto dell'Rx scheletro in toto) sulla base delle indicazioni cliniche.

°° Per i pazienti non in trattamento o in terapia ma in condizioni stabilizzate, il volume degli organi ipocondriaci può essere valutato con cadenza annuale.

REFERENZE

Harmatz P, Kramer WG, Hopwood JJ, Simon J, Butensky E, Swiedler SJ; Mucopolysaccharidosis VI Study Group. Pharmacokinetic profile of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulphatase enzyme replacement therapy in patients with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): a phase I/II study. *Acta Paediatr Suppl.* 2005 Mar;94(447):61-8

Harmatz P, Ketteridge D, Giugliani R, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Yu ZF, Swiedler SJ, Hopwood JJ; MPS VI Study Group. Direct comparison of measures of endurance, mobility, and joint function during enzyme-replacement therapy of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): results after 48 weeks in a phase 2 open-label clinical study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Pediatrics.* 2005 Jun;115(6):e681-9.

Harmatz P, Giugliani R, Schwartz I, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Wraith JE, Beck M, Arash L, Scarpa M, Yu ZF, Wittes J, Berger KI, Newman MS, Lowe AM, Kakkis E, Swiedler SJ; MPS VI Phase 3 Study Group. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or rhASB) and follow-on, open-label extension study. *J Pediatr.* 2006 Apr;148(4):533-539.

Hoogerbrugge PM, Brouwer OF, Bordigoni P, and the European Group for Transplantation. Allogeneic bone marrow transplantation for lysosomal storage diseases. *Lancet* 1995;345:1398–402.

Krivit W. Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI). Treatment by allogeneic bone marrow transplantation in 6 subjects and potential for autotransplantation bone marrow gene insertion. *Int Pediatr* 1992;7:47–52.

Krivit W, Pierpont ME, Ayaz K, et al. Bone-marrow transplantation in the Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI). Biochemical and clinical status 24 months after transplantation. *N Engl J Med* 1984;311:1606–11.

Lowry RB, et al. An update on the frequency of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia. *Human Genet* 1990;85:389–90.

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 1999;281:249–54.

Nelson J. Incidence of the mucopolysaccharidosis in Northern Ireland. *Human Genet* 1997; 101:355–8.

Wraith JE, Vellodi A, Cleary MA, et al., Guidelines for the Investigation and Management of Mucopolysaccharidosis type VI, March 2006.

http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/DH_4131928

MUCOPOLISACCARIDOSI DI TIPO VI (MPS VI)

RACCOMANDAZIONI PER LA TERAPIA ENZIMATICA SOSTITUTIVA (ERT): CRITERI DI INCLUSIONE, ESCLUSIONE ED USCITA.

PREMESSA

Per essere valutati per il trattamento, i pazienti o i tutori legali devono firmare un consenso informato (un “contratto”) per accettare i criteri di inclusione, esclusione ed uscita dalla terapia e la richiesta di compliance al trattamento e al follow-up.

CRITERI DI INCLUSIONE (1-3)

3. Dovrebbero essere considerati per il trattamento immediato i pazienti con MPSVI (di solito senza interessamento neurologico o con lieve interessamento neurologico) con almeno uno tra i seguenti segni o sintomi:

1A. Segni di ostruzione delle vie aeree superiori, come sindrome delle apnee ostruttive del sonno, diagnosticate mediante polisonnografia, e definite come indice apnea/ipoapnea >5 negli adulti o >1 nei bambini, o saturazione di ossigeno notturna $<85\%$ negli adulti o $<92\%$ nei bambini. **Nota:** l'indice apnea/ipopnea è il numero medio di apnee o ipopnee per ora di sonno.

1B. Storia di difficoltà d'intubazione; uso di pressione positiva continua (CPAP) o BiPAP, che indicherebbero una significativa ostruzione delle vie aeree superiori.

1C. Coinvolgimento respiratorio sintomatico, o asintomatico, incluso insufficienza respiratoria restrittiva, quando confermato da test di funzionalità respiratoria che indichino una capacità vitale forzata $<80\%$ del predetto.

1D. Disfunzione miocardica, indicata da una riduzione della frazione d'eiezione $<56\%$ (valori normali $56-78\%$).

Se la frazione d'eiezione non è affidabile, allora dovrebbe essere comunque dimostrata una significativa alterazione della funzione sistolica.

1E. Evidenza di ridotta resistenza allo sforzo definita mediante test del cammino dei 6 minuti (6MWT). Una distanza percorsa al 6MWT di <350 metri dovrebbe essere considerata un'indicazione al trattamento.

1F. Pazienti con sintomi e segni suggestivi di aumentata pressione intracranica come cefalea ricorrente e papilledema (questi pazienti potrebbero anche richiedere un trattamento chirurgico).

2. Pazienti con MPSVI severa che si presentano nel primo anno di vita, ma sono troppo piccoli per praticare i test baseline. **Nota:** il trattamento di questo gruppo di pazienti dovrebbe cominciare immediatamente, dal momento che essi tendono a sviluppare una forma di MPS VI più rapidamente pro progressiva. Appena i pazienti raggiungono un'età sufficiente, bisognerebbe provare a praticare tutti i test baseline.

3. I pazienti MPSVI che non rispondono ai precedenti criteri dovrebbero essere valutati sistematicamente ogni 6 mesi per mettere in evidenza precocemente un'eventuale progressione

della malattia e per rivalutare dunque nel tempo la loro inclusione in terapia con ERT. L'evidenza di progressione è stabilita per esempio da:

- Una riduzione di almeno il 10% del valore percentuale della capacità vitale forzata rispetto al predetto
- Una riduzione di almeno il 10% della frazione d'eiezione
- Una riduzione di almeno il 10% della distanza percorsa al 6MWT

in assenza di complicanze specifiche di malattia suscettibili di terapia chirurgica, come lesione valvolare cardiaca o mielopatia cervicale.

Nota: il valore del 10% è arbitrario e suscettibile di revisione, in quanto non esistono dati specifici al riguardo.

Questi pazienti possono essere considerati invece eleggibili di trattamento immediato soltanto in presenza di forte motivazione da parte dei pazienti e/o delle famiglie; dovrebbero in tal caso ricevere dettagliate informazioni riguardo l'efficacia, la sicurezza dell'ERT (incluso la possibile insorgenza di effetti collaterali), il protocollo di follow-up (frequenza delle infusioni e procedure di valutazione clinico-strumentali). Dovrebbero essere chiaramente coscienti della mancanza di una evidenza chiara che la ERT sia efficace nel prevenire l'insorgenza di problemi clinici correlati alla malattia sottostante sebbene, analogamente a quanto dimostrato per la Malattia di Gaucher, l'efficacia della ERT nel prevenire le manifestazioni cliniche sia molto probabile.

CRITERI DI ESCLUSIONE (4)

4A. pazienti di sesso femminile in gravidanza o allattamento che, una volta informate, non accettino il rischio remoto di danno per il feto o il lattante.

4B. Pazienti ritenuti troppo compromessi

4C. Presenza di un'altra malattia rischiosa per la vita, diversa dall'MPSVI, la cui prognosi possa essere difficilmente modificata dalla ERT.

4D. I pazienti o i genitori che non accettino di firmare un consenso informato (un "contratto") per aderire ai criteri di inclusione, esclusione ed uscita dalla terapia e alla richiesta di compliance al trattamento e follow-up.

CRITERI DI USCITA (5)

5A. Il trattamento dovrebbe essere interrotto se il paziente sviluppa una complicanza che minaccia la vita che difficilmente possa beneficiare della ERT, incluso severe reazioni associate alle infusioni non controllate da cortisonici o riduzione della velocità di infusione.

5B. Mancata compliance del paziente al regime terapeutico raccomandato o alle visite di follow-up clinico-strumentale.

5C. Evidenza di progressione di malattia, nonostante regolare terapia, indicata da:

- Una riduzione di almeno il 10% del valore percentuale della capacità vitale forzata rispetto al valore predetto
- Una riduzione di almeno il 10% della frazione d'eiezione
- Una riduzione di almeno il 10% della distanza percorsa al 6MWT

in assenza di complicanze specifiche di malattia suscettibili di terapia chirurgica, come lesione valvolare cardiaca o mielopatia cervicale.

Nota: il valore del 10% è arbitrario e suscettibile di revisione, in quanto non esistono dati specifici al riguardo.

L'evidenza di progressione di malattia dovrebbe essere confermata almeno due volte in un periodo di 6 mesi.

NOTA AGGIUNTIVA

Il trapianto di midollo osseo può essere considerato una possibile opzione terapeutica alternativa in pazienti selezionati con fenotipo severo.

Working group: Andria, Bembi, Dionisi-Vici, Fecarotta, Rossi

PROPOSTA DI RACCOMANDAZIONI E DATABASE PER LA MALATTIA DI NIEMANN-PICK DI TIPO C

INTRODUZIONE

La malattia di Niemann-Pick di tipo C è una lipidosi lisosomiale complessa trasmessa con ereditarietà autosomica recessiva, con una prevalenza stimata nei paesi europei di circa 1/120.000 - 1/150.000 nati (1, 2).

Le basi genetiche sono eterogenee. La malattia è determinata da mutazioni di due geni, recentemente riconosciuti, NPC1 e NPC2 (3, 4). Il gene NPC1 è mutato nel 95% dei casi mentre il gene NPC2 è coinvolto solo in alcune famiglie. La patogenesi consiste in un'anomalia del trasporto intracellulare del colesterolo esogeno (LDL), con accumulo lisosomiale di colesterolo non esterificato e ritardo dell'innesco delle reazioni di omeostasi del colesterolo.

Quadro clinico

Le manifestazioni cliniche sono eterogenee e l'età di esordio è variabile. I sintomi di presentazione possono dipendere dal coinvolgimento viscerale con epato-splenomegalia e interstiziopatia polmonare o dal coinvolgimento del sistema nervoso centrale con disturbi neurologici progressivi e talora disturbi psichiatrici.

Classicamente vengono distinti quattro fenotipi principali in base all'età di esordio: Forma neonatale, forma infantile grave (20% dei casi), fenotipo "classico" (60-70% dei casi) con esordio infantile tardivo o giovanile, forma adulta (10% dei casi).

L'esordio precoce è associato ad una più rapida progressione. I principali sintomi sono di seguito elencati (OMIM 257220; 607625)

SISTEMA NERVOSO CENTRALE

- Ipotonia
- Ritardo dello sviluppo psicomotorio
- Disartria
- Ritardo del linguaggio/mutismo
- Regressione mentale/demenza
- Spasticità
- Distonia
- Convulsioni
- Atassia cerebellare
- Cataplessia
- Manifestazioni psichiatriche: problemi comportamentali, psicosi
- Oftalmoplegia sopranucleare

FUNZIONE DEGLUTITIVA

- Incoordinazione della deglutizione e disfagia

ADDOME

- Epatomegalia
- Ittero neonatale
- Insufficienza epatica fatale nell'infanzia (occasionale)

Splenomegalia
APPARATO RESPIRATORIO
Interstiziopatia polmonare

EMATOLOGIA

Cellule da accumulo midollari
Istiociti blu mare

Diagnosi

La diagnosi di malattia di Niemann-Pick di tipo C è suggerita dal quadro clinico e confermata mediante **studi biochimici**, mettendo in evidenza le anomalie del traffico del colesterolo in fibroblasti cutanei coltivati mediante il filipin-staining e il test di esterificazione (1). In tutti i pazienti dovrebbe essere praticata l'**analisi molecolare** dei geni NPC1 e NPC2 per l'ulteriore conferma diagnostica e caratterizzazione molecolare.

La consulenza genetica per l'individuazione dei portatori e la diagnosi prenatale sono possibili solo tramite l'analisi molecolare nelle famiglie in cui è noto il genotipo del caso indice (5).

Terapia

Attualmente non è disponibile alcun trattamento efficace per i pazienti affetti da malattia di Niemann-Pick di tipo C.

Il trapianto epatico ed il trapianto di midollo sembrano migliorare i sintomi viscerali, ma non influenzano la progressione della malattia neurologica (6, 7)). Le strategie terapeutiche basate sulla riduzione del colesterolo intracellulare, mediante dieta a ridotto apporto di colesterolo o farmaci ipocolesterolemizzanti non sono risultate efficaci (8, 9).

Approcci terapeutici sperimentali

Il riconoscimento del potenziale ruolo patogenetico dell'accumulo di glicolipidi, in particolare a livello del sistema nervoso centrale, nella malattia di Niemann-Pick di tipo C (10), è il razionale per strategie terapeutiche sperimentali con farmaci inibitori della sintesi di glicolipidi capaci di attraversare la barriera ematoencefalica, quali la N-butildeossinoirimicina (miglustat - Zavesca®). Gli studi in modelli animali hanno dimostrato un ritardo nella comparsa dei sintomi ed un aumento della sopravvivenza degli animali trattati (11)

L'unica esperienza pubblicata, su una singola paziente adulta, suggerisce un cauto ottimismo (12). Attualmente sono in corso trial sperimentali di fase II/III presso la Columbia University di New York (USA) e il Royal Children's Hospital di Manchester (UK) per valutare l'efficacia e la sicurezza del miglustat in pazienti affetti da malattia di Niemann-Pick di tipo C, i cui risultati preliminari sembrano incoraggianti (13)

In Italia è stato di recente approvato dall'Agenzia Italiana del Farmaco un progetto di ricerca multicentrico per valutare l'efficacia e la sicurezza del miglustat in pazienti affetti da malattia di Niemann-Pick di tipo C. Pertanto alcuni pazienti italiani stanno ricevendo il trattamento con miglustat a dosaggi variabili tra 100 mg e 600 mg al giorno in base all'età e al peso del paziente.

RACCOMANDAZIONI PER LA GESTIONE DEL PAZIENTE AFFETTO DA MALATTIA DI NIEMANN-PICK DI TIPO C

La gestione del paziente affetto da NPC, in attesa dello sviluppo di terapie specifiche, è basata principalmente su terapie di supporto. La natura progressiva dei sintomi determina la necessità di un monitoraggio periodico. Per i pazienti arruolati nel progetto multicentrico italiano saranno praticate le valutazioni previste dal protocollo. In tutti i pazienti (anche se non trattati) dovrebbero essere previste alcune valutazioni cliniche e strumentali (come da tabella 1), quando applicabili, in base alle condizioni cliniche e alle capacità collaborative dei pazienti.

SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Valutazioni periodiche:

- Valutazione neurologica obiettiva
- Test psicometrici variabili in base all'età ed alle capacità cognitive del paziente: Griffith's mental scale, test di Baley, Wechsler-Bellevue scale (WIPPSI, WISC-R, WAISS)
- Valutazione audiologica completa (esame impedenziometrico, audiometrico, BAER)
- Valutazione del grado di autonomia motoria e della disabilità mediante scale standardizzate (Walton and Gardner-Medwin scale, PEDI scale)
- Elettroencefalogramma
- Valutazione della velocità di conduzione mediante registrazione di potenziali evocati uditivi, visivi, motori e somatosensoriali
- Valutazione morfologica tradizionale dell'encefalo mediante RMN
- Valutazione RMN spettroscopica dell'encefalo (valutazione dei picchi di NA/cre e CHO/cre)

Terapia di supporto:

- terapie riabilitative
- farmaci anti-epilettici e anti-distonici

Per valutare la progressione dei sintomi neurologici è raccomandata una periodica valutazione clinica e strumentale al fine di definire lo stadio della malattia (14); inoltre è raccomandato l'uso di scale standardizzate per monitorare l'autonomia motoria ed il grado di disabilità: Walton and Gardner-Medwin scale, PEDI scale.

Gli esami di neuroimaging non sono specifici e possono evidenziare un'atrofia corticale e cerebellare. La RMN spettroscopica cerebrale nei pazienti NPC mostra un coinvolgimento diffuso del SNC i cui risultati sembrano correlare con la gravità del quadro clinico (15).

L'elettroencefalogramma può evidenziare un rallentamento diffuso dell'attività elettrica cerebrale o alterazioni di tipo epilettico (1).

Gli studi elettrofisiologici possono rivelare alterazioni dei tempi di conduzione centrale di potenziali evocati visivi, somatosensoriali e soprattutto uditivi (1, 16).

SISTEMA VISIVO

Valutazioni periodiche:

- Visita oculistica
- studio dei movimenti oculari: velocità dei saccadici verticali e orizzontali (se possibile)

I pazienti NPC sviluppano un'oftalmoplegia verticale sopranucleare. Ove possibile lo studio dei movimenti saccadici degli occhi è raccomandato.

STUDIO DELLA DEGLUTIZIONE

Valutazioni periodiche:

- valutazione clinica della capacità di deglutizione, osservando il paziente durante l'assunzione di quattro sostanze di differente consistenza:
 - 5 ml di acqua da una tazzina
 - 1 cucchiaino di puree
 - 1 cucchiaino di pastina (sabbolina)
 - 1/3 di un biscotto

Per ogni sostanza la capacità di deglutizione deve essere valutata assegnando un punteggio, secondo la seguente scala:

4 punti: nessuna difficoltà

3 punti: lieve difficoltà

2 punti: difficoltà moderata

1 punto: difficoltà severa

0 punti: non è capace di deglutire

- studio della deglutizione in videofluoroscopia (ove possibile)

Terapia di supporto:

- riabilitazione della deglutizione
- alimentazione entrale con sonda nasogastrica
- alimentazione enterale con PEG

I pazienti NPC sviluppano una progressiva alterazione della funzione deglutitiva e pertanto è raccomandata una valutazione periodica. La valutazione clinica può essere effettuata secondo la metodologia utilizzata nel trial sperimentale in corso negli Stati Uniti e a Manchester (13). Ove possibile è utile una valutazione videofluoroscopica (17).

ADDOME

Valutazioni periodiche:

- Ecografia addominale e valutazione doppler dei vasi portali
- RMN o TC per volume fegato e milza (nei pazienti in trattamento con miglustat)

Il monitoraggio periodico della visceromegalia e dei segni di ipertensione portale mediante ecografia e doppler è raccomandato. Un'ulteriore valutazione con una misura precisa dei volumi epatico e splenico è raccomandata nei pazienti in trattamento con miglustat per monitorare l'efficacia della terapia sulla visceromegalia.

APPARATO RESPIRATORIO

Valutazioni periodiche:

- Radiografia del torace AP e LL
- Registrazione di sintomi respiratori e del numero di pregresse infezioni
- Misurazione della frequenza respiratoria
- Misurazione della saturazione di ossigeno mediante sonda percutanea o emogasanalisi arterioso
- Valutazione del fabbisogno di ossigeno

Terapia di supporto:

- fisioterapia respiratorio
- ossigenoterapia
- antibiotico terapia mirata in caso di infezioni

I pazienti con NPC, (soprattutto in caso di mutazioni di NPC2), possono presentare un coinvolgimento respiratorio con infezioni ricorrenti e fabbisogno di ossigeno. Il monitoraggio dei segni di coinvolgimento respiratorio è pertanto raccomandato.

ROUTINE EMATOCHIMICA E MARCATORI DI ACCUMULO

Valutazioni periodiche:

- crasi ematica, indici biochimici di funzionalità d'organo ed esame delle urine
- Livelli di chitotriosidasi sierica

Attualmente non sono disponibili test di screening o markers ematologici specifici; tuttavia, poiché l'attività della chitotriosidasi può risultare moderatamente aumentata, si raccomanda il monitoraggio periodico di tale parametro (1, 18).

In aggiunta ai test su indicati, nei pazienti in trattamento con miglustat, sono raccomandate le valutazioni relative alla sicurezza del trattamento e, ove possibile, la valutazione della qualità di vita.

MONITORAGGIO DI EFFETTI COLLATERALI

- registrazione di terapie concomitanti
- registrazione di eventi avversi
- visita oculistica per trasparenza mezzi diottrici
- modifica di parametri fisici e biochimici

VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DELLA VITA

- questionario SF36 per i pazienti adulti
- questionario CHQPF50 per i pazienti di età pediatrica

Per i pazienti affetti da NPC si raccomanda un monitoraggio periodico (compatibilmente con le capacità collaborative del paziente), come sintetizzato nella tabella 1.

I pazienti arruolati nel trial sperimentale saranno valutati secondo le procedure previste nel protocollo.

Tabella 1: valutazioni raccomandate in pazienti con NPC

	Valutazione basale	Ogni 3 mesi	Ogni 6 mesi	Ogni 12 mesi
Filipin test e test di eterificazione del colesterolo	X			
Analisi molecolare	X			
Età alla diagnosi	X			
Esame fisico generale	X	X		
Parametri auxologici				
▪ Peso	X	X		
▪ Altezza	X	X		
▪ Circonferenza cranica	X	X		
Routine ematochimica ed esame urine	X	X		
Chitotriosidasi	X	X		
Valutazione neurologica				
▪ Esame neurologico	X		X	
▪ Test psicometrici	X		X	
▪ Potenziali evocati uditivi, visivi, motori, somatosensoriali	X		X	
▪ Esame impedenziometrico	X		X	
▪ Valutazione del grado di disabilità (Walton and Gardner-Medwin scale, PEDI scale)	X		X	
▪ Elettroencefalogramma	X		X	
▪ RMN encefalo	X			X
▪ RMN cerebrale spettroscopica	X			X
Valutazione oculistica				
▪ Studio dei movimento oculari	X		X	
Valutazione della deglutizione				
▪ Clinica	X		X	
▪ Videofluoroscopica (ove possibile)	X		X	
Valutazione organomegalia e ipertensione portale				
▪ Ecografia addome e doppler vasi portali	X		X	
Valutazione del coinvolgimento respiratorio				
▪ Radiografia del torace AP e LL	X		X	
▪ Registrazione di sintomi respiratori e del numero di pregresse infezioni	X	X		
▪ Misurazione della frequenza respiratoria	X	X		
▪ Misurazione della saturazione di ossigeno mediante sonda percutanea o emogasanalisi arterioso	X	X		
▪ Valutazione del fabbisogno di ossigeno	X	X		

Test aggiuntivi per il monitoraggio dell'efficacia e della sicurezza della terapia con miglustat per i pazienti in trattamento				
	Valutazione basale	Ogni 3 mesi	Ogni 6 mesi	Ogni 12 mesi
Volume fegato (RMN), in alternativa diametro long lobo epatico dx (ecografia)	X		X	
Volume milza (RMN), in alternativa diametro long (ecografia)	X		X	
Valutazioni di sicurezza <ul style="list-style-type: none"> ▪ registrazione di terapie concomitanti ▪ registrazione di eventi avversi ▪ visita oculistica per trasparenza mezzi diottrici 	X X X	X X	X	
Qualità della vita <ul style="list-style-type: none"> ▪ SF36 per i pazienti adulti ▪ CHQPF50 per i pazienti di età pediatrica 	X		X	

Referenze:

1. Patterson M, Vanire MT, Suzuki K et al. (2001). The Niemann-Pick disease type C: a lipid trafficking disorder. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill
2. Vanier MT, Millat G. Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet* 2003; 64: 269-281).
3. Bauer P, Knoblich R, Bauer C et al. NPC1: complete genomic sequence, mutation analysis and characterization of haplotypes. *Hum Mut* 2002; 19: 30-38
4. Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H et al. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* 2000; 290: 2298-2301
5. Vanier MT. Prenatal diagnosis of Niemann-Pick diseases types A, B and C. *Prenat Diagn.* 2002 Jul;22(7):630-2.
6. Gartner JC, Bergman I, Malatack JJ et al. Progression of neurovisceral storage disease with supranuclear ophthalmoplegia following orthotopic liver transplantation. *Pediatrics* 1986; 77: 104
7. Hsu YS, Hwu WL, Huang SF et al. Niemann-Pick disease type C a cellular cholesterol lipidosis, treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 103 – 107
8. Patterson MC, Di Bisceglie AM, Higgins JJ et al. The effect of cholesterol-lowering agents on hepatic and plasma cholesterol in Niemann-Pick disease type C. *Neurology* 1993; 43: 61-64
9. Somers KL, Brown DE, Fulton R et al. Effects of dietary cholesterol restriction in a feline model of Niemann-Pick type C disease. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24: 427-436
10. te Vrugte D, Lloyd-Evans E, Veldman RJ et al. Accumulation of glycosphingolipids in Niemann Pick C disease disrupts endosomal transport. *J Biol Chem* 2004
11. Zervas M, Somers KL, Thrall MA et al. Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C. *Current Biology* 2001; 11: 1283-1287
12. Lachmann RH, te Vrugte D, Lloyd-Evans E et al. Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann-Pick disease type C. *Neurobiol of disease* 2004; 16: 654-658
13. Patterson M, Vecchio D, Prady H et al. Oral miglustat in adult and pediatric patients with Niemann-pick type C (NPC) disease: rationale, methodology and interim analyses of a clinical study. *Congresso Internazionale dell'American Society of Human Genetics* (Salt Lake City, ottobre 2005)
14. Higgins JJ, Patterson MC, Dambrosia JM et al. A clinical staging classification for type C Niemann-Pick disease. *Neurology* 1992; 42(12): 2286-90

15. Tedeschi G, Bonavita S, Barton NW et al. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in the clinical evaluation of patients with Niemann-Pick type C disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65: 72-79
16. Pikus A. Audiologic profile in Niemann-Pick C. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 630: 313 – 4
17. Gates J, Hartnell GG, Gramigna GD. Videofluoroscopy and swallowing studies for neurologic disease: a primer. *Radiographics*. 2006 Jan-Feb;26(1):e22
18. Guo Y, He W, Boer AM et al. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inherited Metab Dis*. 1995; 18: 717-22

Working group: Rossi, Fecarotta, Bembi, Di Rocco, Donati, Parenti

PROPOSTA DI RACCOMANDAZIONI PER MALATTIA DI POMPE (GLICOGENOSI DI TIPO 2)

INTRODUZIONE

La Malattia di Pompe o glicogenosi di tipo 2, è una malattia da accumulo lisosomiale, causata dal deficit di alfa-glucosidasi acida (GAA, maltasi acida). Tale difetto determina accumulo di glicogeno lisosomiale. L'ereditarietà è autosomica recessiva. L'incidenza è di circa 1:40.000. (Hirschhorn et al, 2001)

QUADRO CLINICO

Il quadro clinico è estremamente variabile e comprende i seguenti fenotipi:

FORMA AD ESORDIO INFANTILE, CLASSICA

- Esordio a meno di 2 anni d'età, in genere nei primi mesi di vita
- Cardiomiopatia ipertrofica
- ECG: intervallo P-R corto e complessi QRS ampi; possibili aritmie.
- Miopatia scheletrica
- Ipetransaminasemia con aumento del CK
- Ritardo dello sviluppo motorio e regressione motoria
- Polmoniti ricorrenti
- Insufficienza cardiorespiratoria
- Possibile epatomegalia
- Possibile macroglossia
- Storia naturale di decesso nel primo anno di vita

FORMA AD ESORDIO INFANTILE, NON CLASSICA

- Esordio nei primi 2 anni di vita
- Segni di cardiomiopatia senza conseguenze emodinamiche significative
- Miopatia scheletrica
- Ipetransaminasemia con aumento del CK
- Polmoniti ricorrenti
- Insufficienza respiratoria
- Possibile epatomegalia
- Possibile macroglossia
- Prognosi variabile

FORMA AD ESORDIO TARDIVO

- Esordio successivo ai 2 anni di vita (a seconda dell'età di esordio: forme giovanili, adulte)
- Assenza di coinvolgimento cardiaco significativo
- Miopatia scheletrica
- Ipetransaminasemia con aumento del CK
- Progressivo deterioramento motorio conseguente alla miopatia degenerativa
- Possibile insufficienza respiratoria ed infezioni respiratorie ricorrenti
- Rara epatomegalia
- Rara macroglossia

- Prognosi variabile a seconda della severità della patologia

COMPLICANZE

Sono stati riportati in pazienti Pompe la possibile presenza di complicanze ortopediche (tra cui scoliosi, rigidità articolari, lussazioni articolari, osteopenia e fratture patologiche secondarie ad immobilità), ipoacusia specialmente nelle forme infantili (probabilmente da danno cocleare). Sono stati riportati anche segni suggestivi di un possibile coinvolgimento del sistema nervoso (ritardo di mielinizzazione cerebrale, possibile coinvolgimento neuronale delle corna anteriori midollari); Riportata occasionalmente presenza di aneurismi dei vasi cerebrali e l'insorgenza di febbre elevata, persistente, non correlata apparentemente a stati settici, non responsiva a terapie antipiretiche forse di origine centrale.

(Bembi et al., 2003; Braunsdorf, 1987; Chien et al., 2006; Hagemans et al., 2005; Hagemans et al., 2005; Hagemans et al., 2006; Hirschhorn et al., 2001; Kamphoven et al., 2004; Kishnani et al., 2004; Kishnani et al., 2006; Kishnani et al., 2006; Martini et al., 2001; Miyamoto et al. 1985; Pellegrini et al., 2005; Slonim et al., 2000; Van den Hout et al., 2003; Winkel et al., 2005; OMIM: #232300).

CONFERMA DIAGNOSTICA

La diagnosi, sospettata sulla base del quadro clinico, deve essere confermata mediante **analisi enzimatica** della GAA su:

- Fibroblasti cutanei e/o
- Biopsia mucolare

L'analisi enzimatica su linfociti può essere non del tutto affidabile

L'**analisi molecolare** del gene GAA serve per confermare la diagnosi enzimatica e permette la consulenza nelle famiglie in cui è noto il genotipo del caso indice (Hirschhorn et al., 2001; Kishnani et al., 2004; Pichiecchio et al., 2004; <http://www.pompecenter.nl/>).

Possono essere utili, anche se non diagnostiche, le seguenti indagini:

- L'esame istologico di biopsia muscolare che dimostra l'accumulo di glicogeno
- L'elettromiografia che può evidenziare un danno miopatico
- La Risonanza Magnetica dei muscoli, che può evidenziare l'accumulo di glicogeno

DIAGNOSI PRENATALE

E' possibile la diagnosi prenatale di Malattia di Pompe mediante dosaggio dell'attività enzimatica dell'alfa-glucosidasi acida su campioni di villi coriali freschi (tra la 10^a e la 12^a settimana di gestazione) oppure su amniociti coltivati da liquido amniotico prelevato in 16^a settimana.

La caratterizzazione molecolare del caso indice familiare aumenta l'affidabilità della diagnosi prenatale in quanto permette di associare l'analisi enzimatica a quella molecolare.

(Hirschhorn et al., 2001; Kishnani et al., 2004; Kishnani et al., 2006)

TERAPIA ENZIMATICA SOSTITUTIVA

E' in commercio un prodotto per terapia enzimatica sostitutiva (ERT) con:

- GAA ricombinante umana prodotta da cellule CHO ricombinanti (Myozyme®)

Ad oggi sono stati pubblicati una serie di studi osservazionali sull'efficacia e sicurezza della ERT nella malattia di Pompe.

Efficacia.

Tali studi hanno dimostrato che **la ERT è efficace** nel trattamento della **cardiomiopatia ipertrofica** (Amalfitano et al., 2001; Kishnani et al., 2006; Kishnani et al., 2007; Klinge et al. 2005; Klinge et al. 2005; Van den Hout et al. 2000; Van den Hout et al. 2001; Van den Hout et al. 2004)

L'effetto sulla miopatia scheletrica sembra **variabile**, in dipendenza soprattutto del grado di severità della miopatia all'inizio del trattamento, e della precocità dell'inizio del trattamento. I pazienti che cominciano la terapia in condizioni di base migliori, e più precocemente, sembrano essere quelli nei quali vi è una maggiore probabilità che la ERT risulti efficace. Nei pazienti con miopatia in stato avanzato sembra meno probabile che la ERT possa determinare effetti rilevanti. (Amalfitano et al., 2001; Kishnani et al., 2006; Kishnani et al., 2006; Kishnani et al., 2007; Klinge et al. 2005; Klinge et al. 2005; Van den Hout et al. 2000; Van den Hout et al. 2001; Van den Hout et al. 2004; Winkel et al. 2004)

Sicurezza.

I pazienti sottoposti ad ERT devono essere strettamente monitorati per la possibile insorgenza di reazioni avverse. Si possono avere reazioni durante l'infusione o nelle ore successive, tra cui febbre e reazioni di tipo anafilattico. (Amalfitano et al., 2001; Kishnani et al., 2006; Kishnani et al., 2007; Klinge et al. 2005; Klinge et al. 2005; Reuser et al., 2002; Van den Hout et al. 2000; Van den Hout et al. 2001; Van den Hout et al. 2004; Winkel et al. 2004).

E' stata descritta anche la possibile insorgenza di sindrome nefrosica (Hunley et al., 2004)

I pazienti in trattamento devono attenersi strettamente a protocolli di follow-up (Vedi oltre).

Inoltre, prima dell'infusione, i pazienti devono essere sottoposti ad accurato esame clinico. In caso di eventi patologici acuti in atto, l'infusione di rhGAA è sconsigliata.

Durante le infusioni i parametri vitali (compreso frequenza cardiaca, frequenza respiratoria, pressione arteriosa e temperatura corporea) vanno monitorati almeno all'inizio dell'infusione, ogni 30 minuti, al termine dell'infusione e a due ore dal termine.

Per il trattamento delle reazioni avverse durante le infusioni, si rimanda alle linee guida fornite dalla ditta produttrice.

La maggioranza dei pazienti in ERT sviluppano anticorpi anti-GAA. Non è chiaro ad oggi se tale risposta immunitaria influenzi l'efficacia dell'ERT o sia connessa con la possibile insorgenza di eventi avversi. Tali aspetti richiedono ulteriori studi.

(Amalfitano et al., 2001; Kishnani et al., 2006; Kishnani et al., 2007; Klinge et al. 2005; Klinge et al. 2005; Reuser et al., 2002; Van den Hout et al. 2000; Van den Hout et al. 2001; Van den Hout et al. 2004; Winkel et al. 2004)

Indicazioni.

In Italia è stato di recente approvato dall'AIFA l'utilizzazione del farmaco ottenuto da cellule CHO ricombinanti (Myozyme ® prodotto dalla ditta Genzyme) per il trattamento della Malattia di Pompe in tutti i pazienti con diagnosi confermata. Viene specificato nell'autorizzazione che i benefici del Myozyme sulla malattia di Pompe ad esordio tardivo non sono ancora stati accertati.

Il dosaggio raccomandato è di: 20mg/Kg di peso corporeo/ogni due settimane, aumentabile fino a 40 mg/kg in base al decorso clinico e alla risposta al trattamento.

DIETA

La possibile utilità di una dieta ad alto contenuto proteico, suggerita in passato da osservazioni aneddotiche, non è stata dimostrata con certezza. Una supplementazione di L-alanina, proposta in passato, non sembra portare benefici significativi.

(Bodamer et al. 1997; Bodamer et al. 2000; Bodamer et al. 2002; Hirschhorn et al., 2001; Kishnani et al., 2004; Mundy et al., 2006, Ravaglia et al., 2006).

Dal punto di vista dietetico, è opportuno assicurare nel bambino piccolo un apporto nutrizionale adeguato ed un apporto di proteine pari al 20-25% delle calorie.

VALUTAZIONE BASALE E FOLLOW-UP

I pazienti sottoposti ad ERT arruolati in protocolli sperimentali vengono sottoposti a periodici controlli clinici previsti dai singoli protocolli terapeutici.

I pazienti non ancora sottoposti a terapia dovrebbero comunque essere sottoposti a periodici controlli clinici.

Per entrambe le categorie di pazienti un protocollo minimo di follow-up dovrebbe comprendere le indagini riportate in **Tabella 1**.

Per i pazienti sottoposti ad ERT, ogni 6 mesi va praticato il **dosaggio degli anticorpi anti-farmaco**.

(Amalfitano et al., 2001; Ansong et al., 2006; Brooke et al., 1981; Case et al., 2006 ; Cook et al., 2006; Guyatt et al., 1985; Haley et al., 1992 ; Haley et al., 2003; 6:77-84. Hagemans et al., 2005; Kishnani et al., 2006; Kishnani et al., 2007; Klinge et al. 2005; Klinge et al. 2005; Piper, 1994; Russel et al., 2002; Van den Hout et al. 2000; Van den Hout et al. 2001; Van den Hout et al. 2004; Van der Ploeg, 2005; Ware et al., 1998; Winkel et al. 2004; Wraith et al., 2006)

Tabella 1A

FORME AD ESORDIO INFANTILE	Baseline	Ogni 3 mesi	Ogni 6 mesi	Ogni anno
CONFERMA DIAGNOSI E CONSULENZA GENETICA	X			
ESAMI GENERALI				
Esame clinico (con peso, altezza e circ. cranica, freq cardiaca e respiratoria, pressione arteriosa)	X	X*		
Routine ematochimica (con emocromo, VES, PCR, cloro, creatininemia, glicemia, potassio, sodio, urea, albumina, proteine totali, acido urico, calcio, fosforo, fosfatasi alcalina, bilirubina totale, transaminasi, CK, CK-MB, LDH, ferro, eq. acido-base)	X		X	
VALUTAZIONE CARDIOLOGICA				
Visita cardiologica	X	X*		
ECG basale	X	X*		
ECG holter nelle 24 ore	X			X
Ecocardiografia con misurazione del ventricolo sinistro: - Massa (g) - frazione d'eiezione (%) - frazione d'accorciamento (%)	X	X*		
VALUTAZIONE RESPIRATORIA				
Valutazione pneumologica con eventuali: - Rx torace (basale, e poi solo su indicazione clinica) - Valutazione saturazione O2 transcutanea - Valutazione del supporto respiratorio, se richiesto - Funzionalità respiratoria (es. spirometria), se possibile.	X	X*		
Polisonnografia	X			X
VALUTAZIONE NEUROMOTORIA				
Visita neurologica e valutazione dell'acquisizione delle principali tappe dello sviluppo psicomotorio	X	X*		
Test di livello globale. Possibili test: - Bayley Scales of Infant Development (oppure Alberta Infant Motor Scale), WPPSI, WISC-R,	X		X	
Forza muscolare. Possibili test: - a > 4 anni d'età: Manual Muscle Testing secondo il Medical Research Council score (MMT/MRC)	X		X	
Funzione muscolare. Possibili test: - Gross Motor Function Measure (GMFM) - >4anni d'età: Walton and Gardner-Medwin scale	X		X	
Se possibile, valutazione della resistenza funzionale motoria. Possibili test: - Test del cammino dei 6 minuti	X		X	
Grado di disabilità. Possibili test: - Pompe Pediatric Evaluation of Disability Inventory (PEDI) ≤ 14 anni	X		X	
Per escludere presenza di denervazione come segno di coinvolgimento delle corna anteriori midollari: elettromiografia e/o potenziali evocati somatosensoriali	X			X (su indicazione clinica)
ALTRE INDAGINI/CONSULENZE				
Valutazione ortopedica	X		X	
Valutazione fisiatrice per stabilire e rivalutare nel tempo programma di fisioterapia	X		X	
DEXA (se disponibile software per età pediatrica)	X			X
ABR	X			X
In caso di macroglossia e/o sublussazione della mandibola e/o malocclusione: valutazione odontostomatologica	X		X	
Valutazione dietologica per stabilire adeguato input nutrizionale	X	X*		
In caso di sintomatologia suggestiva di RGE: studio della deglutizione e approfondimento (pHmetria e/o endoscopia)	X			X
Questionario sulla qualità della vita: Possibili test: <14 anni: PedsQL; > 14 anni: SF-36	X			X

***: Per i pazienti di età ≥2 anni: indagini eseguibili ogni 6 mesi.**

Tabella 1B

FORME AD ESORDIO TARDIVO	Baseline	Ogni 6 mesi	Ogni anno
CONFERMA DIAGNOSTICA E CONSULENZA GENETICA	X		
ESAMI GENERALI			
Esame clinico (con peso, altezza e circ. cranica, freq cardiaca e respiratoria, pressione arteriosa)	X	X	
Routine ematochimica (con emocromo, VES, PCR, cloro, creatininemia, glicemia, potassio, sodio, urea, albumina, proteine totali, acido urico, calcio, fosforo, fosfatasi alcalina, bilirubina totale, transaminasi, CK, CK-MB, LDH, ferro, eq. acido-base)	X	X	
VALUTAZIONE CARDIOLOGICA			
Visita cardiologia	X	X	
ECG	X	X	
ECG holter 24 ore	X		X (su indicazione clinica)
Ecocardiografia con misurazione del ventricolo sinistro: - Massa (g) - frazione d'eiezione (%) - frazione d'accorciamento (%)	X	X (solo su indicazione clinica)	
VALUTAZIONE RESPIRATORIA			
Valutazione pneumologica con eventuali: - Rx torace (basale, e poi solo su indicazione clinica) - Valutazione saturazione O2 transcutanea - Valutazione del supporto respiratorio, se richiesto - Funzionalità respiratoria (es. spirometria), se possibile.	X	X	
Polisonnografia	X		X
VALUTAZIONE NEUROMOTORIA			
Visita neurologica e valutazione dell'acquisizione delle principali tappe dello sviluppo psicomotorio	X	X	
Test di livello globale. Bayley, WPPSI, WISC-R, WAIS	X	X	
Forza muscolare. Possibili test: - a > 4 anni d'età: Manual Muscle Testing secondo il Medical Research Council score (MMT/MRC)	X	X	
Funzione muscolare. Possibili test: - Gross Motor Function Measure (GMFM) - >4anni d'età: Walton and Gardner-Medwin scale	X	X	
Se possibile, valutazione della resistenza funzionale motoria. Possibili test: - Test del cammino dei 6 minuti	X	X	
Grado di disabilità Possibili test: - Pompe Pediatric Evaluation of Disability Inventory (PEDI) ≤ 14 anni - Rotterdam 9-Items Handicap Scale ≥ 14 anni	X	X	
Per escludere presenza di denervazione come segno di coinvolgimento delle corna anteriori midollari: elettromiografia e/o potenziali evocati somatosensoriali	X		X (solo su indicazione clinica)
ALTRE INDAGINI/CONSULENZE			
Valutazione ortopedica	X	X	
Valutazione fisiatrica per stabilire e rivalutare nel tempo programma di fisioterapia	X	X	
DEXA	X		X
ABR	X	X	
In caso di macroglossia e/o sublussazione della mandibola e/o malocclusione: valutazione odontostomatologica	X	X	
Valutazione dietologica per stabilire adeguato input nutrizionale	X	X	
In caso di sintomatologia suggestiva di RGE: studio della deglutizione e approfondimento (pHmetria e/o endoscopia)	X		X
Questionario sulla qualità della vita: > 14 anni: SF-36	X		X

Naturalmente in base alle condizioni cliniche dei pazienti, i medici curanti valuteranno l'integrazione di tale protocollo con ulteriori indagini.

RISCHIO ANESTESIOLOGICO

I pazienti con malattia di Pompe sono a rischio di avere severe complicanze in seguito alla somministrazione di alcuni anestetici (Ing et al., 2004): in particolare la somministrazione di Succinilcolina (o Suxamethonium) si associa ad un rischio di aritmia, iperpotassiemia e rabdomiolisi e tale farmaco è controindicato nella malattia di Pompe. Se possibile, va evitata l'intubazione. **Tali aspetti andrebbero discussi con la famiglia al momento della diagnosi.**

Inoltre, in occasione di qualunque procedura che richieda un'anestesia, il medico metabolista dovrebbe **discutere preventivamente il caso con l'anestesista**, ed il paziente dovrebbe sottoporsi ad un'accurata valutazione clinica preventiva.

In caso di necessità di intervento chirurgico, possono risultare utili l'Ecocardiografia pre-operatoria, ECG intraoperatorio, attenta osservazione post-operatoria con monitoraggio di parametri di laboratorio (es. potassiemia, mioglobinuria, CK sierica) per il rischio di rabdomiolisi ed ipertermia maligna

Altre Raccomandazioni terapeutiche

In presenza di cardiomiopatia ipertrofica severa del VS l'uso di digossina, altri farmaci inotropi, diuretici, ACE inibitori va considerato con prudenza. Sono riportati morti improvvise dopo utilizzo di beta-bloccanti nei pazienti con malattia di Pompe. Vanno evitati variazioni della portata (disidratazione, iperidratazione)

Tutte le infezioni polmonari vanno trattate aggressivamente. Le vaccinazioni vanno raccomandate

Per quanto riguarda l'aspetto nutrizionale, va escluso un reflusso gastroesofageo e, quando presente va trattato (evitando il trattamento chirurgico). L'alimentazione deve assicurare nel bambino piccolo un apporto nutrizionale adeguato ed un apporto di proteine pari al 20-25% delle calorie.

REFERENZE

- Amalfitano A, Bengur AR, Morse RP, et al: Recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: results of a phase I/II clinical trial. *Genet Med* 2001; 3: 132-138.
- Ansong AK, Li JS, Nozik-Grayck E, et al. Electrocardiographic response to enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Genet Med*. 2006;8(5):297-301.
- Bembi B, Ciana G, Martini C, et al. Efficacy of multidisciplinary approach in the treatment of two cases of nonclassical infantile glycogenosis type II. *J Inherit Metab Dis*. 2003;26(7):675-81.
- Bodamer OA, Leonard JV, Halliday D. Dietary treatment in late-onset acid maltase deficiency. *Eur J Pediatr*. 1997;156 1:S39-42.
- Bodamer OA, Halliday D, Leonard JV. The effects of l-alanine supplementation in late-onset glycogen storage disease type II. *Neurology*. 2000 12;55(5):710-2.
- Bodamer OA, Haas D, Hermans MM, et al. L-alanine supplementation in late infantile glycogen storage disease type II. *Pediatr Neurol*. 2002;27(2):145-6.
- Braunsdorf WE. Fusiform aneurysm of basilar artery and ectatic internal carotid arteries associated with glycogenosis type 2 (Pompe's disease). *Neurosurgery*. 1987 21(5):748-9
- Brooke MH, Griggs RC, Mendell JR, et al: Clinical trial in Duchenne dystrophy. I. The design of the protocol. *Muscle Nerve* 1981; 4:186-197.
- Case LE, Kishnani PS. Physical therapy management of Pompe disease. *Genet Med*. 2006;8(5):318-27.
- Case LE, Hanna R, Frush DP, Krishnamurthy V, et al. Fractures in children with Pompe disease: a potential long-term complication. *Pediatr Radiol*. 2007 Mar 7; Epub ahead of print.
- Chien YH, Lee NC, Peng SF, Hwu WL. Brain development in infantile-onset Pompe disease treated by enzyme replacement therapy. *Pediatr Res*. 2006 Sep;60(3):349-52.
- Cook AL, Kishnani PS, Carboni MP, et al. Ambulatory electrocardiogram analysis in infants treated with recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Genet Med*. 2006;8(5):313-7.
- Guyatt GH, Sullivan MJ, Thompson PJ, et al. The 6-minute walk: a new measure of exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Can Med Assoc J* 1985;132:919-923.
- Haley SM, Coster WJ, Ludlow LH, et al. The Pediatric Evaluation of Disability Inventory. Boston: Center for Rehabilitation Effectiveness, Boston University; 1992.
- Haley SM, Fragala MA, Aseltine R, et al: Development of a disease-specific disability instrument for Pompe disease. *Pediatr Rehabil* 2003; 6:77-84.
- Hagemans ML, Winkel LP, Hop WC, et al: Disease severity in children and adults with Pompe disease related to age and disease duration. *Neurology* 2005; 28;64:2139-2141.

Hagemans ML, Winkel LP, Van Doorn PA, et al: Clinical manifestation and natural course of late-onset Pompe's disease in 54 Dutch patients. *Brain* 2005; 128: 671-677.

Hagemans ML, Hop WJ, Van Doorn PA, et al. Course of disability and respiratory function in untreated late-onset Pompe disease. *Neurology*. 2006 28;66(4):581-3.

Hirschhorn R, Reuser AJJ: Glycogen storage disease type II: acid α -glucosidase (acid maltase) deficiency, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds): *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York, NY: McGraw-Hill, 2001, 3389-3420.

Hunley TE, Corzo D, Dudek M, et al. Nephrotic syndrome complicating alpha-glucosidase replacement therapy for Pompe disease. *Pediatrics*. 2004 Oct;114(4):e532-5.

Ing RJ, Cook DR, Bengur RA, et al. Anaesthetic management of infants with glycogen storage disease type II: a physiological approach. *Paediatr Anaesth*. 2004;14(6):514-9.

Kishnani PS, Howell RR: Pompe disease in infants and children. *J Pediatr* 2004; 144(5 Suppl): S35-43.

Kishnani PS, Hwu WL, Mandel H, et al.: Infantile-Onset Pompe Disease Natural History Study Group. A retrospective, multinational, multicenter study on the natural history of infantile-onset Pompe disease. *J Pediatr*. 2006;148(5):671-676.

Kishnani PS, Nicolino M, Voit T, et al. Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid alpha-glucosidase in infantile-onset Pompe disease. *J Pediatr*. 2006 Jul;149(1):89-97.

ACMG Work Group on Management of Pompe Disease; Kishnani PS, Steiner RD, et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med*. 2006;8(5):267-88.

Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, et al. Recombinant human acid [alpha]-glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology*. 2007 Jan 9;68(2):99-109.

Klinge L, Straub V, Neudorf U, Voit T: Enzyme replacement therapy in classical infantile Pompe disease: results of a ten-month follow-up study. *Neuropediatrics* 2005; 36:6-11.

Klinge L, Straub V, Neudorf U, et al: Safety and efficacy of recombinant acid alpha-glucosidase (rhGAA) in patients with classical infantile Pompe disease: results of a phase II clinical trial. *Neuromuscul Disord* 2005; 15:24-31.

Martini C, Ciana G, Benettoni A, et al. Intractable fever and cortical neuronal glycogen storage in glycogenosis type 2. *Neurology*. 2001 11;57(5):906-8.

Miyamoto Y, Etoh Y, Joh R, et al. Adult-onset acid maltase deficiency in siblings. *Acta Pathol Jpn*. 1985;35(6):1533-42.

Mundy HR, Williams JE, Cousins AJ, Lee PJ. The effect of L-alanine therapy in a patient with adult onset glycogen storage disease type II. *J Inherit Metab Dis*. 2006;29(1):226-9.

OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM&itool=toolbar>

Pellegrini N, Laforet P, Orlikowski D, et al., Respiratory insufficiency and limb muscle weakness in adults with Pompe's disease. *Eur Respir J*. 2005;26(6):1024-31.

Pichiecchio A, Uggetti C, Ravaglia S, et al. Muscle MRI in adult-onset acid maltase deficiency. *Neuromuscul Disord*. 2004;14(1):51-5.

Piper MCaD. *J Motor Assessment of the Developing Infant*. Philadelphia: W B Saunders Company, 1994.

Ravaglia S, Pichiecchio A, Rossi M, et al. Dietary treatment in adult-onset type II glycogenosis. *J Inherit Metab Dis*. 2006 Aug;29(4):590.

Reuser AJ, Van Den Hout H, Bijvoet AG, et al: Enzyme therapy for Pompe disease: from science to industrial enterprise. *Eur J Pediatr* 2002;161:S106-11.

Russell D, Rosenbaum PL, Avery LM, Lane M. Gross Motor Function Measure (GMFM-66 & GMFM-88) User's Manual. London: Mac Keith Press, 2002.

Slonim AE, Bulone L, Ritz S, et al: Identification of two subtypes of infantile acid maltase deficiency. *J Pediatr* 2000; 137:283-285.

Van den Hout H, Reuser AJ, Vulto AG, et al: Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. *Lancet* 2000; 56:397-398.

Van den Hout JM, Reuser AJ, de Klerk JB, et al: Enzyme therapy for pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24:266-74.

Van den Hout HM, Hop W, van Diggelen OP, et al: The natural course of infantile Pompe's disease: 20 original cases compared with 133 cases from the literature. *Pediatrics* 2003; 112:332-40.

Van den Hout JM, Kamphoven JH, Winkel LP, et al: Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from milk. *Pediatrics* 2004; 113:e448-57.

Van der Ploeg AT. Monitoring of pulmonary function in Pompe disease: a muscle disease with new therapeutic perspectives. *Eur Respir J*. 2005;26(6):984-5.

Varni JW, Seid M, Rode CA. The PedsQL: measurement model for the pediatric quality of life inventory. *Med Care*. 1999 Feb;37(2):126-39.

Ware JE Jr., Gandek B. Overview of the SF-36 Health Survey and the International Quality of Life Assessment (IQOLA) Project. *J Clin Epidemiol* 1998;51:903-912.

Winkel LPF, Van den Hout JM, Kamphoven JH, et al: Enzyme replacement therapy in late onset Pompe's disease: a three year follow up. *Ann Neur* 2004; 55: 495-502.

Winkel LP, Hagemans ML, van Doorn PA, et al: The natural course of non-classic Pompe's disease; a review of 225 published cases. *J Neurol* 2005; 252:875-84.

Wraith JE, Lee P, Vellodi A, Cleary MA, et al. Guidelines for the Investigation and Management of Infantile Pompe disease. 2006.

[http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/ PublicationsPolicyAndGuida](http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuida)

GLICOGENOSI DI TIPO II (Malattia di Pompe).

RACCOMANDAZIONI PER LA TERAPIA ENZIMATICA SOSTITUTIVA (ERT): CRITERI DI INCLUSIONE, ESCLUSIONE ED USCITA.

PREMESSA

Per essere valutati per il trattamento, i pazienti o i tutori legali devono firmare un consenso informato (un “contratto”) per accettare i criteri di inclusione, esclusione ed uscita dalla terapia e la richiesta di compliance al trattamento e al follow-up.

CRITERI D’INCLUSIONE (1-3)

1. Pazienti in età pediatrica con una diagnosi di Glicogenosi di tipo II posta sulla base della documentazione di un deficit di alfa-glucosidasi acida misurata su fibroblasti cutanei, o tessuto muscolare confermato dall’analisi molecolare del gene dell’alfa-glucosidasi.

Questa definizione include sia pazienti con la forma classica infantile, che si presentano con cardiomiopatia severa nei primi mesi di vita, sia pazienti che si presentano senza cardiomiopatia (forme infantili non classiche, forme ad esordio tardivo che si presentano clinicamente tra i 2 ed i 18 anni d’età).

2. Pazienti con forma ad esordio tardivo giovanile-adulta che presentino alla valutazione baseline segni clinici di debolezza muscolare, anche lievi.

3. Pazienti con forma giovanile-adulta che si presentano con iperCKemia asintomatica a qualsiasi età: dovrebbero essere valutati sistematicamente ogni 6 mesi per mettere in evidenza precocemente un’eventuale comparsa di segni di debolezza muscolare, e per rivalutare dunque nel tempo la loro inclusione in terapia con ERT. L’evidenza di progressione è stabilita da:

- Una regressione motoria documentata alle visite neurologiche
- Una riduzione dei punteggi di forza e funzione muscolare (MMT/MRC, GMFM)
- Una riduzione di almeno il 10% della distanza percorsa al 6MWT

verosimilmente attribuibili alla patologia metabolica di base e non ad altre eventuali patologie concomitanti. .

Nota: il valore del 10% è arbitrario e suscettibile di revisione, in quanto non esistono dati specifici al riguardo.

Questi pazienti possono essere considerati invece eleggibili al trattamento immediato soltanto in presenza di forte motivazione da parte dei pazienti e/o delle famiglie; dovrebbero in tal caso ricevere dettagliate informazioni riguardo l’efficacia, la sicurezza dell’ERT (incluso la possibile insorgenza di effetti collaterali), il protocollo di follow-up (frequenza delle infusioni e procedure di valutazione clinico-strumentali). Dovrebbero essere coscienti che i benefici di Myozyme non sono stati dimostrati con chiarezza nella forma di Glicogenosi di tipo II ad insorgenza tardiva (caratterizzata solo dalla miopatia scheletrica, in assenza di cardiomiopatia significativa) e che non c’è nessuna evidenza che la terapia enzimatica sostitutiva possa prevenire l’insorgenza dei sintomi.

CRITERI DI ESCLUSIONE (4)

4A. Pazienti in gravidanza o allattamento che, una volta informate, non accettino il rischio remoto di danno per il feto o il lattante. Myozyme, comunque, non deve essere usato durante la gravidanza, se non in caso di assoluta necessità. L’alfa-glucosidasi può essere escreta nel latte materno: poiché non si dispone di dati sugli effetti nei neonati esposti all’alglucosidasi alfa tramite il latte materno, si consiglia di interrompere l’allattamento durante il periodo di assunzione di Myozyme.

4B. Pazienti con coinvolgimento del sistema muscolo-scheletrico così grave da non poter prevedere qualunque efficacia della terapia.

4C. Presenza di un'altra malattia rischiosa per la vita, diversa dalla glicogenosi II, la cui prognosi possa essere difficilmente modificata dalla ERT (es. presenza di patologie tumorali gravi, decadimento cognitivo, esiti invalidanti di stroke o di altre malattie internistiche, positività per HIV).

4D. I pazienti o i genitori che non accettino di firmare un consenso informato (un “contratto”) per aderire ai criteri di inclusione, esclusione ed uscita dalla terapia e alla richiesta di compliance al trattamento e follow-up.

CRITERI DI USCITA (5)

5A. Il trattamento dovrebbe essere interrotto se il paziente sviluppa una complicanza che minaccia la vita, che difficilmente possa beneficiare della ERT, incluso severe reazioni associate alle infusioni, non controllate da cortisonici o riduzione della velocità di infusione.

5B. Mancata compliance del paziente al regime terapeutico raccomandato o alle visite di follow-up clinico-strumentale.

5C. Evidenza di progressione di malattia verso uno stadio severo, nonostante regolare terapia, indicata ad esempio da:

- Sviluppo di fabbisogno di ventilazione invasiva per 24 ore/giorno, per un periodo di 2 settimane o più, non dovuto a insufficienza cardiorespiratoria progressiva, o problemi concomitanti potenzialmente reversibili (es. infezioni o scoliosi suscettibile di terapia chirurgica), ed in associazione ad un tono muscolare così compromesso da non permettere movimenti utili.



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA



IX Giornate "Giovani"
di
**Prospettive
in pediatria**

con il patrocinio della Società Italiana di Pediatria

ATTI

15-17 FEBBRAIO 2007

Aula di Pediatria (Edif. 11)
Policlinico dell'Università "Federico II"
Via S. Pansini, 5 – Napoli

RISCHIO GENETICO HLA-CORRELATO NELLA MALATTIA CELIACA

Esposito O., Natale C., Camarca M.E., Di Mase R., Pianese A., Terrone G., Del Mastro A., Timpone L., D'Aniello M., Storch S., Limongelli M.G., Auricchio R.

Dipartimento di Pediatria, Università degli studi di Napoli Federico II

Obiettivi: Diversi studi hanno mostrato una più alta prevalenza di celiachia nei fratelli di pazienti affetti rispetto a quella della popolazione generale con un rischio che viene stimato tra l'8 e il 12%; tuttavia questo rischio non è lo stesso per tutti i fratelli. L'obiettivo dello studio è quello di stimare il rischio reale che ha un fratello di un paziente celiaco di sviluppare la malattia ed inoltre di fornire ai genitori di un bambino affetto una stima quanto più precisa possibile del rischio per un eventuale nuovo nato.

Metodi: Abbiamo reclutato una coorte di 188 famiglie italiane composte da un probando affetto, almeno un fratello ed entrambi i genitori. In tutti i componenti del nucleo familiare è stato determinato lo stato di malattia mediante indagini sierologiche ed eventuale biopsia ed è stata effettuata la tipizzazione molecolare HLA-DQ. Per aumentare le dimensioni del campione e per migliorare la stima del rischio, abbiamo considerato altri 127 probandi, reclutati in un nostro precedente lavoro (Margaritte-Jeannin P. *et al.* HLA-DQ relatives risk for coeliac disease in European population: a study of the European Genetic cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigen* 2004;63:562-7.)

Risultati: Il rischio di un fratello di un paziente celiaco di sviluppare la malattia è del 10%, con un range tra lo 0,1 e il 29% nel momento in cui vengono considerate le informazioni ottenute dall'HLA-DQ del probando, dei genitori e dei fratelli. Abbiamo riscontrato un rischio trascurabile (meno dell'1%) per il 40% dei fratelli sani, un rischio maggiore dell'1% ma inferiore al 10% per il 30% di questi ed infine un rischio alto o molto alto (circa il 25%) in un altro 30%.

Conclusioni: Questi risultati permettono di fornire ai genitori di un bimbo affetto una più precisa informazione circa il rischio reale di un nuovo caso, anche prima della nascita. In tal modo è possibile offrire uno specifico follow-up ai bambini identificati a più alto rischio.

UN RARO CASO DI GLAUCOMA IN UN PAZIENTE CON MUCOPOLISACCARIDOSI TIPO II

*Fecarotta S. *, Maggio E. °, Astarita L. *, Agovino T. *, Giordano L. *, Ungaro C. *, Minichini L. *, Parenti G. *, Simonelli F. °*

*Dipartimento di Pediatria - Università di Napoli Federico II; °Dipartimento di Oftalmologia - Seconda Università di Napoli

La Mucopolisaccaridosi di tipo II (MPS II) è una malattia da accumulo lisosomiale, ad ereditarietà X-linked, caratterizzata dal deficit dell'enzima iduronato-2-solfatasi, con accumulo di glicosaminoglicani (GAG), quali eparan e dermatansolfato. Il quadro clinico è caratterizzato da facies caratteristica, bassa statura, disostosi ossea, rigidità articolare, visceromegalia, coinvolgimento respiratorio e cardiaco e variabile interessamento del SNC. Il coinvolgimento oculare è comune in tutti i tipi di MPS. Le più frequenti complicanze oculari includono opacità corneali, retinopatia, atrofia ottica, aumento della pressione intraoculare (IOP) e glaucoma. Il glaucoma dipende dall'accumulo di GAG a livello della camera anteriore o del sistema trabecolare. La diagnosi si basa su tre segni caratteristici: aumento della IOP, atrofia glaucomatosa del nervo ottico ed alterazioni del campo visivo. A differenza di altre MPS (tipo I e tipo VI) il glaucoma non è una complicanza oculare caratteristica della MPSII.

Riportiamo un caso di glaucoma in un paziente di 9 anni con MPSII, che sin dall'età di 2 anni ha presentato elevata IOP in assenza di altre alterazioni. La valutazione oftalmologica completa mediante determinazione dell'acuità visiva con ottotipo di Snellen, esame del senso cromatico con tavole di Ishihara, biomicroscopia con lampada a fessura, tonometria ad applanazione, esame del fondo oculare (FO), tomografia ottica computerizzata (OCT), esame del campo visivo (CV) computerizzato, elettroretinogramma (ERG), mappa fotografica del FO, ha dimostrato visus e senso cromatico normali, assenza di opacità corneale, normale IOP durante terapia con latanoprost, accentuazione dell'escavazione fisiologica del disco ottico, aree di depigmentazione retinica focale, alterazioni del CV riconducibili all'ipertono oculare. All'ERG sono stati registrati tracciati flicker e fotopici nella norma, massimale e scotopici subnormali.

I risultati delle indagini effettuate hanno consentito di porre diagnosi di glaucoma e di identificare la presenza di una iniziale retinopatia.

Il caso di AS dimostra che, seppure raramente, il glaucoma può essere una complicanza oculare anche in pazienti affetti da MPS II, sottolineando l'importanza del monitoraggio della IOP, del CV e delle caratteristiche della papilla in tutti i pazienti affetti da mucopolisaccaridosi. Inoltre il paziente sta praticando un trattamento sperimentale mediante terapia enzimatica sostitutiva, ed un attento monitoraggio oculistico potrà contribuire alla valutazione degli effetti della terapia a livello oculare.



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA

In Scientia Spes



IX Giornate "Giovani" *di* **Prospettive in pediatria**

con il patrocinio della Società Italiana di Pediatria

ATTI

15-17 FEBBRAIO 2007

Aula di Pediatria (Edif. 11)
Policlinico dell'Università "Federico II"
Via S. Pansini, 5 – Napoli

COMUNICAZIONI DI GIOVANI RICERCATORI

Giovedì 15 Febbraio: ore 16.00 – 16.30

ACCURATEZZA DIAGNOSTICA DEGLI ATOPY PATCH TEST CON ALIMENTI FRESCHI O CON KIT COMMERCIALE IN BAMBINI CON SINTOMI GASTROINTESTINALI E SOSPETTA ALLERGIA ALIMENTARE

Porcaro F., Ruotolo S., Auricchio L., Caldore M. °, Tardi M., Terrin G., Siani M.C., Manguso F., Troncone R., Berni Canani R.*

Dipartimenti di Pediatria e di *Dermatologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli "Federico II"; ° Ospedale Santobono, Napoli

ANALISI DELLA VIA p53-bax IN PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA (LLA) DELL'ETA' PEDIATRICA

Affinita M.C., Siano M., Pota E., Romano M., Crisci S., D'Angelo V., Savarese R.

Servizio di Oncologia Pediatrica – SUN

PROCALCITONINA E PCR COME PREDITTORI DI INFEZIONI BATTERICHE SEVERE NEI LATTANTI E NEI BAMBINI FEBBRILI IN UN PRONTO SOCCORSO PEDIATRICO

Bressan S., Andreola B., Callegaro S., Da Dalt L.

Dipartimento di Pediatria, Università di Padova

Venerdì 16 Febbraio: ore 12.00 – 13.00

NEUTROPENIA E MIELOCATESSI COME SINTOMI DI PRESENTAZIONE DELLA SINDROME WHIM

Bennato V., Guerci S., Marniga E., Notarangelo L., Tassone L., Ricci F., Soresina A., Sensi A., Notarangelo L.D., Badolato R., Plebani A.

Clinica Pediatrica dell'Università di Brescia.

LA VALUTAZIONE ECOGRAFICA DELLO SPESSORE VESCICALE NELLA DIAGNOSI E NEL FOLLOW-UP DELLE ENURESIS NON-MONOSINTOMATICHE

*Tafuro L., Iervolino L.R., Grimaldi M., Verni M.T., Sirigu A., Torino M., Rea M., R. Del Gado **

*U.o.c. Diagnosi e Terapia delle Uropatie infantili, AOU SUN

Scuola di Specializzazione in Pediatria, sun

RIDUZIONE DELLA SINTESI DI SUBSTRATO MEDIANTE TERAPIA CON MIGLUSTAT NELLA MALATTIA DI NIEMANN-PICK TIPO C (NPC)

S. Fecarotta, A. Romano*, G. Mansi*, °M. Amitrano, L. Astarita*, D. Bruschini*, T. Agovino*, C. Ungaro*, G. Parenti*, G. Andria**

*Dipartimento di Pediatria - Università di Napoli Federico II

°Dipartimento di Diagnostica per Immagini e Radioterapia - Università di Napoli Federico II

S6K1- AND TRCP-MEDIATED DEGRADATION OF PDCD4 PROMOTES PROTEIN TRANSLATION AND CELL GROWTH

N. Valerio Dorrello#, A. Peschiaroli*, D. Guardavaccaro*, N.H. Colburn^, N.E. Sherman**, M. Pagano**

*Department of Pathology, NYU Cancer Institute, New York University School of Medicine, 550 First Avenue, MSB 599, New York, NY 10016, USA

^Laboratory of Cancer Prevention, National Cancer Institute, Bldg. 576, Frederick, MD 21702, USA

** W.M. Keck Biomedical Mass Spectrometry Lab, University of Virginia, Charlottesville, VA 22908, USA

#Current address: Department of Pediatrics, University of Padua, Padua, Italy

RIDUZIONE DELLA SINTESI DI SUBSTRATO MEDIANTE TERAPIA CON MIGLUSTAT NELLA MALATTIA DI NIEMANN-PICK TIPO C (NPC)

*Fecarotta S. *, Romano A. *, Mansi G. *, Amitrano M. °, Astarita L. *, Bruschini D. *, Agovino T. *, Ungaro C. *, Paladino S. *, Parenti G. *, Andria G. **

**Dipartimento di Pediatria - Università di Napoli Federico II; °Dipartimento di Diagnostica per Immagini e Radioterapia - Università di Napoli Federico II*

La NPC è una rara malattia da accumulo lisosomiale, caratterizzata da sintomi neurologici progressivi (ritardo/regressione psicomotoria, sindrome cerebellare, incoordinazione della deglutizione, segni piramidali) e coinvolgimento viscerale con età di esordio e fenotipo variabili. La NPC è causata da mutazioni dei geni NPC1 o NPC2, con difetto del trafficking del colesterolo. Non è disponibile una terapia efficace. E' stato dimostrato l'accumulo di glicolipidi, soprattutto a livello del SNC, il cui potenziale ruolo patogenetico è il razionale per strategie terapeutiche con farmaci inibitori della sintesi di glicolipidi capaci di attraversare la BEE come il miglustat.

Scopo dello studio è verificare l'efficacia e la sicurezza della terapia con miglustat in pazienti affetti da NPC. Gli outcome primari sono il miglioramento/arresto della progressione dei sintomi neurologici e della deglutizione. Gli outcome secondari sono il miglioramento/stabilizzazione di parametri elettrofisiologici (EEG, potenziali evocati), della visceromegalia e del coinvolgimento polmonare.

Quattro pazienti, tra 2 e 13 anni, sono stati trattati con miglustat (100-400 mg/die) per 6-12 mesi. I pazienti presentano eterogeneità fenotipica e genetica (in 3 pazienti è coinvolto il gene NPC1; in 1 il gene NPC2).

Metodi: esame neurologico e test psicometrici, videofluoroscopia della deglutizione, EEG, potenziali evocati, ecografia e/o RMN addome, Rx e HRCT torace.

Relativamente agli outcome primari, in tutti i pazienti si è osservato il miglioramento della deglutizione; l'esame neurologico e i test psicometrici hanno dimostrato nella paziente 1 (13 anni) un quadro clinico stabile, fatta eccezione per l'esordio di epilessia; la paziente 2 (10 anni) è stabile; la paziente 3 (11 anni) ha presentato una lenta progressione dei sintomi; il paziente 4 (2 anni) ha presentato miglioramento dello sviluppo psicomotorio, soprattutto nelle aree sociale e motoria. Relativamente agli outcome secondari gli studi elettrofisiologici hanno mostrato miglioramento dei potenziali evocati uditivi in tutti i pazienti; la visceromegalia presenta un trend in aumento; il coinvolgimento respiratorio è stazionario, con miglioramento della HRCT in un caso (caso 4).

I risultati dello studio, al momento preliminari, saranno meglio valutati nell'ambito di un trial multicentrico italiano coordinato dal Dipartimento di Pediatria dell'Università di Napoli "Federico II", nel quale sono arruolati 15 pazienti.

CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI DA SANGUE DI CORDONE OMBELICALE: CARATTERIZZAZIONE E VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ IMMUNOMODULATORIE

Gabelli M.

Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Università degli Studi di Padova, Padova

Nell'ambito dell'oncologia pediatrica, il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSC) da midollo osseo (BM) o da sangue di cordone ombelicale (CB), è una procedura di largo utilizzo pur presentando notevoli limitazioni, quali lo sviluppo di malattia da trapianto contro l'ospite (GVHD).

Nel midollo osseo, oltre alle HSC, sono state isolate cellule staminali di tipo mesenchimale (MSC), simil-fibroblastiche, in grado di crescere in adesione alle piastre di coltura e differenziare verso linee cellulari del mesoderma. Alcuni studi hanno evidenziato la capacità immunomodulatoria delle MSC da midollo osseo, per cui esse, se co-infuse durante il trapianto alle HSC, potrebbero diminuire il rischio di GVHD nel ricevente.

Recentemente le MSC sono state identificate in tessuti diversi da quello midollare, tra i quali il sangue di cordone ombelicale, già utilizzato come fonte di HSC per i trapianti in ambito pediatrico.

Obiettivo di questo lavoro è stato selezionare cellule con caratteristiche proprie delle MSC da sangue cordonale sfruttando l'esistenza e l'esperienza della Banca di Sangue Cordonale di Padova, e successivamente testarne, per la prima volta, le proprietà di immunomodulazione in vitro.

I campioni di sangue cordonale, processati mediante metodica di immunodeplezione e successiva centrifugazione su gradiente di densità, hanno dato origine a popolazioni mesenchimali nel 20,7% delle unità processate. Le MSC da CB sono state analizzate riguardo al fenotipo e alla capacità differenziativa in senso osteogenico, adipogenico e miogenico, mostrando caratteristiche sovrapponibili alle MSC da BM.

Poste in co-cultura con linfociti allogenici, le MSC da CB, come quelle da BM, non hanno determinato una risposta proliferativa linfocitaria. Si sono dimostrate soppressive in modo dose dipendente nei confronti della crescita di linfociti stimolati con mitogeno (con una riduzione massima della proliferazione dell'88%) e in colture linfocitarie miste (riduzione del 25%), anche se in quest'ultime le MSC da BM hanno manifestato un effetto inibitorio maggiore rispetto a quelle da CB.

In conclusione abbiamo dimostrato che le MSC da sangue cordonale possiedono caratteristiche molto simili a quelle da midollo osseo e potrebbero costituire una valida alternativa anche in ambito clinico. L'esistenza di banche deputate alla crioconservazione di sangue cordonale e l'assoluta mancanza di rischi e di procedure invasive nella raccolta potrebbero motivare la preferenza verso questa nuova fonte di MSC.

SALUTE SENZA FRONTIERE

Formare medici nel mondo globalizzato

a cura di Mario Delfino e Bruno Amato

Guida

La rete per le malattie rare: un modello di "alleanza per la solidarietà"

S. Fecarotta, D. Melis, I. Scala e G. Andria

Per «malattie rare» si intendono quelle malattie che colpiscono un ristretto numero di soggetti per cui i farmaci potenzialmente utili per trattarle non hanno un mercato sufficiente a ripagare gli investimenti necessari per il loro sviluppo. Tali farmaci vengono definiti «orfani». Ci troviamo quindi di fronte al seguente scenario: il paziente «non ha voce» in quanto isolato, l'industria «non sente» per scarso interesse economico e la società «non vede» o perché non conosce il problema o perché la sua risoluzione rappresenta un onere.

Non esiste una definizione di «rarità» valida per tutti i paesi, ed è quindi difficile stabilire una **definizione univoca di «rarità»** per una malattia. Secondo le indicazioni dell'Unione Europea, una malattia si definisce rara se ha una prevalenza inferiore a 1:2.000 abitanti. Per il Congresso degli Stati Uniti, invece, la soglia è di 200.000 casi nella popolazione totale (ca. 40.000 in Italia).

L'Organizzazione mondiale della Sanità ha identificato 5.000-8.000 malattie rare.

Inaspettatamente, interessano complessivamente una frazione importante della popolazione (1 paziente ogni 1.000 individui). Infatti, sebbene le singole malattie rare interessino un basso numero di soggetti, nel loro complesso coinvolgono una frazione importante della popolazione, rappresentando il 6-8% delle patologie umane conosciute.

Le malattie rare possono essere così classificate:

- malattie genetiche e sindromi malformative (85%)
- malattie infettive
- altre malattie

Una porzione significativa delle malattie rare è rappresentata da malattie genetiche (che includono gli errori congeniti del metabolismo) e da sindromi malformative.

Nonostante le malattie rare siano complessivamente numerose, la singola patologia è spesso «orfana» di strutture sanitarie in grado di riconoscerla e trattare i segni ed i sintomi di essa. La presa in carico del paziente è perciò difficile e non sempre soddisfacente. Inoltre l'esiguo numero di strutture e

operatori sanitari in grado di diagnosticare e trattare una malattia orfana non è distribuita omogeneamente sul territorio.

In conseguenza di ciò i percorsi diagnostico-terapeutici si complicano e le risposte non sono sempre soddisfacenti per i bisogni.

I *problemi* che condizionano maggiormente la qualità dell'assistenza ad un paziente con una malattia rara sono quelli di *natura assistenziale*. Essi determinano:

- scarsa disponibilità di conoscenze scientifiche
- latenza tra esordio della patologia e diagnosi
- ritardo negli interventi
- criteri diagnostici fortemente disomogenei
- difficoltà della ricerca clinica
- esiguo numero di pazienti arruolabili nei trial clinici

Questa realtà contrasta con i diritti dei pazienti di ricevere una diagnosi corretta e tempestiva, di essere adeguatamente informati sul tipo di patologia e sul suo decorso e di ottenere il miglior trattamento possibile.

Al pari di ogni altro paziente, quelli affetti da malattie rare si aspettano di ottenere una diagnosi corretta e tempestiva, di essere correttamente informati e di ottenere il miglior trattamento indipendentemente dalle occasioni e dal luogo.

Per venire incontro a tali esigenze, nel mondo è fiorita una legislazione apposita volta ad affrontare tale problema. Le principali leggi e i relativi paesi ove sono state emanate sono elencati nella tabella 1.

In Italia, il primo passo concreto di solidarietà nei riguardi di pazienti affetti da malattia rara risale al 2001 con l'istituzione di una rete nazionale delle malattie rare e di norme di esenzione per i costi relativi alle prestazioni sanitarie per la cura dei pazienti. Trattasi del Decreto del 18 maggio 2001, n. 279, intitolato «Regolamento di istituzione della rete nazionale delle malattie rare e di esenzione dalla partecipazione al costo delle relative prestazioni sanitarie, ai sensi dell'articolo 5, comma 1, lettera b), del decreto legislativo 29 aprile 1998, n. 124» pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 160 del 12-7-2001- Suppl. Ordinario n.180/L.

Tabella 1 - Principali iniziative legislative in tema di malattie rare

Stato	Anno	Legge
Stati Uniti	1983	Orphan Drug Act
Stati Uniti	2002	Rare Diseases Act
Giappone	1993	Legge sui farmaci orfani
Australia	1997	Accettazione dei farmaci approvati da FDA
Europa	1999	Regolamento sui farmaci orfani

Tabella 2 Elenco delle classi di malattie rare riconosciute dal Ministero della Salute
Decreto del 18 maggio 2001, n. 279

- Malattie infettive
- Tumori
- Malattie endocrine, metaboliche, immunitarie
- Malattie del sangue
- Malattie del sistema nervoso e organi senso
- Malattie del sistema circolatorio
- Malattie dell'apparato digerente
- Malattie dell'apparato genito-urinario
- Malattie della pelle e del sottocutaneo
- Malattie osteomuscolari e del tessuto connettivo
- Malformazioni congenite
- Malattie perinatali
- Sintomi, segni e stati morbosi mal definiti

Tale decreto, tra l'altro, riporta l'elenco delle classi di malattie rare riconosciute dal Ministero della Salute. In tabella 2 è riportato tale elenco.

Nel 2005, la Regione Campania, nella seduta della Giunta del 21 ottobre, con deliberazione n. 1362 relativa all'Area Generale di Coordinamento N. 20 - Assistenza Sanitaria, ha recepito le direttive nazionali con l'individuazione e l'istituzione di Centri Regionali di Riferimento per patologie rare, che includono tutte le Aziende ospedaliere della regione, i due policlinici universitari e i presidi ospedalieri dell'ASL NA1 (vedi tab. 3).

Per quanto riguarda il trattamento delle malattie rare, non sempre le industrie sono interessate ad investire in ricerca per nuovi farmaci, sebbene, per alcuni farmaci sviluppati e commercializzati, le industrie abbiamo

Tabella 3 - Elenco dei presidi di riferimento regionale per le malattie rare

A.O. Cardarelli di Napoli
A.O. Monaldi di Napoli
A.O. Santobono - Pausilipon di Napoli
A.O. S. Sebastiano di Caserta
A.O. S. Giovanni di Dio di Salerno
A.O. Rummo di Benevento
A.O. Moscati di Avellino
Azienda Policlinico "Federico II"
Azienda Policlinico Secondo Ateneo
Fondazione Pascale di Napoli
ASL NA1

realizzato un notevole profitto per gli elevati costi di vendita del singolo prodotto. Sono necessarie quindi incentivazioni all'industria per la ricerca. È quanto ad es. si è realizzato in USA con l'Orphan Drug Act.

In questo contesto, il medico si trova al centro di un'intricata rete di rapporti tra l'industria, che spinge alla prescrizione dei farmaci, le famiglie che premono per la prescrizione di trattamenti anche in fasi molto precoci di sperimentazione clinica, ed il Servizio Sanitario Nazionale, che ha il compito di coprire le spese relative a queste prescrizioni.

Il medico, per poter operare delle scelte terapeutiche in scienza e coscienza e per poter valutare criticamente l'efficacia dei nuovi farmaci messi in commercio, ha bisogno di 'indipendenza' e di essere scevro da ogni pressione nel suo processo decisionale. Per venire incontro a queste esigenze cruciali, l'Agenzia Italiana del Farmaco, dall'anno 2005, ha adottato una politica di promozione della Ricerca Indipendente sui Farmaci, investendo nello studio di Farmaci Orfani e Salvavita e nelle sperimentazioni comparative tra farmaci utilizzando i fondi derivati dai contributi, pari al 5% delle spese promozionali, versati dalle aziende farmaceutiche.

Nel 2005 sono stati emessi bandi di ricerca relativi a 3 aree:

- Area 1 – Farmaci orfani e negletti
- Area 2 – Studi comparativi tra farmaci e strategie farmacologiche
- Area 3 – Farmacovigilanza attiva

Le procedure di selezione nell'espletamento dei bandi sono estremamente trasparenti e indipendenti.

Il una **prima fase** si è proceduto alla valutazione delle lettere di intenti da parte della Commissione "Ricerca e Sviluppo". Nella **seconda fase** i progetti completi sono stati valutati da commissioni indipendenti di esperti stranieri e italiani (*study session*).

Il finanziamento è stato poi erogato sulla base di una graduatoria di merito scientifico fino all'esaurimento dei fondi disponibili. Per trasparenza, sono stati inoltre resi pubblici i criteri con cui sono state prese le decisioni.

Questo processo decisionale ha portato all'approvazione finale ed al finanziamento di 54 protocolli di studio in settori critici della sperimentazione in campo clinico.

Vediamo, più nel dettaglio cosa è avvenuto. In risposta al bando sono state presentate 407 lettere d'intenti da parte di 173 enti partecipanti. Dopo la prima valutazione da parte della Commissione Ricerca e Sviluppo, solo 101 progetti sono stati ammessi alla fase finale di valutazione, e, di questi, sono stati finanziati solo 54 protocolli di studio che rappresentano il 13 % dei progetti presentati.

Tabella 4 Progetti approvati relativi al bando del 2005 riguardante la «Ricerca Indipendente sui Farmaci»

1	Multicenter study of the efficacy and tolerability of tetrahydrobiopterin in a pediatric population affected by phenylketonuria
2	Evaluation of the efficacy of the treatment with ACE-inhibitors on the renal damage in patients affected by glycogen storage disease type 1a and type 1b and of the vitamin E on neutropenia of patients with glycogen storage disease 1b
3	Efficacy and safety of treatment with N-butyl-deoxynojirimycin (NB-DNJ-miglustat) in patients with Niemann-Pick disease type C

Tra tutti i progetti di interesse pediatrico (17 totali), ne sono stati approvati 8 (9 sono stati bocciati) di cui 3 proposti e coordinati dal Dipartimento di Pediatria dell'Università Federico II di Napoli.

I tre progetti riguardano lo studio di nuovi approcci terapeutici per tre malattie metaboliche: la fenilchetonuria, la glicogenosi tipo I e la malattia di Niemann-Pick tipo C.

La *fenilchetonuria* è una malattia ad ereditarietà autosomica recessiva dovuta alla carenza dell'enzima fenilalanina idrossilasi. La sua incidenza nella popolazione è di 1: 10.000. Dal punto di vista clinico è caratterizzata da ritardo psicomotorio, compromissione neurologica, convulsioni, eczema e cute e capelli chiari. Dal punto di vista biochimico invece osserviamo aumento di fenilalanina plasmatici e aumentata escrezione urinaria di fenilchetoni.

La *glicogenosi tipo I* è una malattia autosomica recessiva del metabolismo degli zuccheri con incidenza pari a 1: 40.000. Dal punto di vista clinico è caratterizzata da epatomegalia, ipoglicemia, ipertransaminasemia, dislipidemia e acidosi lattica. Le principali complicanze sono quelle renali, epatiche, il difetto di crescita, la neutropenia (tipo Ib), le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) e le infezioni.

La *malattia di Niemann-Pick tipo C* è una malattia autosomica recessiva da accumulo lisosomiale. L'incidenza è di 1: 150.000. Presenta sintomi neurologici progressivi (RSPM, regressione, sindrome cerebellare, incoordinazione deglutizione, segni piramidali), epatosplenomegalia e coinvolgimento respiratorio. L'età di esordio è variabile. Infatti può esordire in età neonatale, pre-scolare, scolare e adulta.

Il progetto riguardante la **fenilchetonuria** è uno studio multicentrico sull'efficacia e la tollerabilità del trattamento con tetraidrobiopterina volto a valutare se tale trattamento sia in grado di ridurre i livelli di fenilalanina plasmatica, un metabolita tossico, in bambini affetti da fenilchetonuria (PKU)

e se quindi possa essere considerato un valido trattamento farmacologico alternativo o complementare all'attuale terapia dietetica. Il progetto associa 3 Dipartimenti di Pediatria (Università Federico II, Università Magna Graecia-Catanzaro, Ospedale SS Annunziata-Napoli) ed 1 Dipartimento Assistenziale di Medicina di Laboratorio (CEINGE-DasMeLab, Napoli). Il responsabile scientifico e promotore dello studio multicentrico è il prof. Generoso Andria.

Il progetto riguardante la **glicogenosi (GSD) tipo 1** è invece volto a valutare l'efficacia del trattamento con ACE-inibitori sull'evoluzione del danno renale (iperfiltrazione renale, microalbuminuria e proteinuria) nei pazienti con glicogenosi tipo 1 e del trattamento antiossidante con vitamina E sulla neutropenia nei pazienti con glicogenosi tipo 1b. Tale trial multicentrico italiano coinvolge 7 centri, di cui 6 strutture pediatriche (Universitarie, Ospedaliere, IRCCS) e un dipartimento di Fisiopatologia e Medicina Sperimentale. Il responsabile scientifico e promotore è il prof. Giancarlo Parenti.

Infine il terzo progetto è teso a valutare l'efficacia e la sicurezza del trattamento con miglustat in pazienti affetti da **malattia di Niemann-Pick tipo C (NP-C)** per i quali non esiste attualmente nessuna terapia efficace. Trattasi di un trial multicentrico italiano, che coinvolge 11 centri, di cui 8 strutture pediatriche (Universitarie, Ospedaliere, IRCCS), 2 Dipartimenti di Neurologia e un centro per le malattie rare. Il responsabile scientifico e promotore è il prof. Generoso Andria.

Anche nell'anno 2006 sono stati rinnovati i bandi per il finanziamento della ricerca indipendente sui farmaci. Si è registrato un incremento delle adesioni rispetto al precedente anno e precisamente sono state presentate 454 lettere d'intenti da parte di 179 enti partecipanti. Il 27% erano per l'area 1 (Farmaci orfani o per non responders), il 40% per l'area 2 (Confronto tra farmaci e strategie terapeutiche), il 33% per l'area 3 (Farmacoepidemiologia).

Tutto ciò costituisce un forte segnale di interesse e solidarietà sociale che rende possibile un'alleanza tra medici ed enti pubblici competenti allo scopo di migliorare l'assistenza sanitaria.

Congresso Medico Congiunto
SIMGePed – SISMME - SISN
MALATTIE GENETICHE E METABOLICHE IN PEDIATRIA:
DIAGNOSI, PREVENZIONE E ASSISTENZA

Roma, 28 – 30 novembre 2007

ABSTRACT FORM

Inviare a: congressocongiunto@alfa-international.it

Da inviare entro il 20 settembre 2007

Titolo →
grassetto

Autori →
cognome, nome

Afferenza degli autori →

Testo: →
Times New Roman

- ⊗ Dimensione 10 interlinea 1
- ⊗ Non giustificare a destra
- ⊗ totale 250 parole escluso titolo, autori e loro afferenza

**TERAPIA ENZIMATICA SOSTITUTIVA NELLA MUCOPOLISACCARIDOSI TIPO II:
VALUTAZIONI PRELIMINARI DELL'EFFICACIA IN TRE PAZIENTI**

Astarita L¹, Fecarotta S¹, Sibilio M¹, Ungaro C¹, Mansi G¹, Iadecicco ²L, Servodio Iammarrone C², Soscia E³, Andria G¹, Parenti G¹.

¹Dipartimento di Pediatria

²Dipartimento di Medicina Fisica e Riabilitativa

³Dipartimento di Diagnostica per Immagini

-
Università di Napoli Federico II

La Mucopolisaccaridosi (MPS) di tipo II è una malattia da accumulo lisosomiale causata dal deficit dell'enzima iduronato-2-solfatasi, responsabile di accumulo sistemico di glicosaminoglicani (GAG). La MPS II è caratterizzata da coinvolgimento scheletrico, respiratorio, cardiaco, oculare, uditivo e visceromegalia, associati ad un variabile interessamento del SNC.

Di recente è stata introdotta una terapia enzimatica sostitutiva (ERT) per la MPS II con iduronato-2-solfatasi ricombinante, ma le informazioni riguardanti l'efficacia sono limitate ai risultati di un singolo trial multicentrico internazionale e vanno validate su un numero più ampio di pazienti. Abbiamo seguito tre pazienti (SA, LN e MP) affetti da MPS II differenti per età ed espressione fenotipica e trattati con ERT per periodi variabili (36, 6 e 6 mesi, rispettivamente).

L'efficacia della ERT è stata valutata mediante monitoraggio periodico di GAG urinari, 6-Minute Walk Test (6MWT), mobilità articolare, polisonnografia, elettrocardiogramma ed ecocardiogramma, RMN addome, Rx scheletro, test di livello.

I risultati hanno evidenziato riduzione dell'escrezione urinaria dei GAG, migliorata performance al 6MWT, maggiore mobilità di alcune articolazioni prossimali, riduzione della massa ventricolare sinistra, stabilità o riduzione dell'epatosplenomegalia. Non si sono ottenuti, invece, miglioramenti rilevanti del coinvolgimento respiratorio e delle deformità scheletriche, e, come atteso, abbiamo assistito ad una progressione del coinvolgimento neurologico.

I risultati sui nostri pazienti sembrano confermare che nella MPS II la risposta alla ERT di specifici organi o apparati è variabile. Un monitoraggio continuo è necessario per definire l'efficacia a lungo termine e per individuare sottogruppi di pazienti che possano trarre beneficio da questo approccio terapeutico.

Congresso Medico Congiunto
SIMGePed – SISMMME - SISN
MALATTIE GENETICHE E METABOLICHE IN PEDIATRIA:
DIAGNOSI, PREVENZIONE E ASSISTENZA

Roma, 28 – 30 novembre 2007

ABSTRACT FORM

Inviare a: congressocongiunto@alfa-international.it

Da inviare entro il 20 settembre 2007

Titolo →
grassetto

Autori →
cognome, nome

**Afferenza
degli autori** →

Testo: →
Times New Roman

- ⊗ Dimensione 10
interlinea 1
- ⊗ Non giustificare
a destra
totale 250
parole
escluso titolo,
autori e loro
afferenza

**VALUTAZIONE PRELIMINARE DELL'EFFICACIA DELLA TERAPIA CON MIGLUSTAT
IN 4 PAZIENTI CON MALATTIA DI NIEMANN-PICK TIPO C**

Fecarotta S¹, Astarita L¹, Bruschini D¹, Ungaro C¹, Paladino S¹, Amitrano M², Perretti A³, Mansi G¹, Romano A¹, Della Casa R¹, Parenti G¹, Andria G¹

¹Dipartimento di Pediatria

²Dipartimento di Medicina Fisica e Riabilitativa

³Dipartimento di Scienze Neurologiche

Università di Napoli Federico II

La NPC è una malattia da accumulo lisosomiale, causata da un difetto del trafficking del colesterolo e accumulo di glicolipidi, soprattutto a livello del SNC e caratterizzata da disturbi neurologici progressivi, visceromegalia e pneumopatia. Non sono disponibili ad oggi trattamenti efficaci, ma è stata di recente suggerita l'efficacia di terapie con inibitori della sintesi dei glicolipidi come il miglustat, che attraversano la barriera ematoencefalica. Presso il nostro Dipartimento sono attualmente seguiti 4 pazienti (RG1, RG2, GA, OM), in terapia con miglustat da 18 mesi, valutati ogni 6 mesi mediante anamnesi, esame fisico ed assessment neurologico e psicometrico, studio videofluoroscopico della deglutizione, EEG, potenziali evocati, ecografia e/o RMN addome e valutazione dei livelli sierici di chitotriosidasi.

I risultati delle indagini hanno evidenziato una sostanziale stabilità del coinvolgimento neurologico in RG2, un miglioramento in OM, una lenta progressione in RG1 e GA. La deglutizione ed i potenziali evocati (in particolare BAEP) hanno mostrato miglioramento in tutti. Non si è rilevata progressione del coinvolgimento respiratorio, mentre la visceromegalia ha mostrato un trend in aumento. Infine, non sembra esservi una correlazione fra i livelli sierici di chitotriosidasi e la somministrazione del farmaco.

I risultati preliminari appaiono incoraggianti soprattutto nei pazienti che hanno iniziato la terapia in uno stadio meno avanzato di malattia; la risposta al trattamento di diversi organi ed apparati appare eterogenea. L'efficacia di tale approccio terapeutico tuttavia sarà meglio valutata nell'ambito del trial nazionale finanziato dall'AIFA e coordinato dal nostro Dipartimento, che ha arruolato 19 pazienti italiani con NPC (contribuito AIFA FARM59T23W a GA).

Other selected papers of Dr. Simona Fecarotta, published during the PhD program

S. Fecarotta, G. Parenti, P. Vajro, A. Zuppali, R. Della Casa, M.T. Carbone, A. Correrà, G. Torre, S. Riva, C. Dionisi-Vici, F.M. Santarelli, G. Andria.

HHH syndrome (Hyperornithinemia, Hypeprammonemia, Homocitrullinuria), with fulminant hepatitis-like presentation.

J Inherit Metab Dis, 2006; 29: 186-189

Esposito V, Lettierio T, **Fecarotta S**, Sebastio G, Parenti G, Salerno MC.

Growth hormone deficiency in a patient with lysinuric protein intolerance.

Eur J Pediatr 2006; 165: 763-766

S. Fecarotta, G. Andria. *Hematological manifestations in inborn errors of metabolism.* Ital J Pediatr 2006; 32: 241-250

Sebastio G, **Fecarotta S**, Sperandio MP. Lysinuric protein intolerance. Online publication in Gene Reviews 2006 (<http://www.genetests.org>)

SHORT REPORT

HHH syndrome (hyperornithinaemia, hyperammonaemia, homocitrullinuria), with fulminant hepatitis-like presentation

S. Fecarotta · G. Parenti · P. Vajro · A. Zuppaldi ·
R. Della Casa · M. T. Carbone · A. Correra · G. Torre ·
S. Riva · C. Dionisi-Vici · F. M. Santorelli · G. Andria

Received: 3 March 2005 / Accepted: 7 June 2005
© SSIEM and Springer 2006

Summary We report a 3-year-old Italian patient with the hyperornithinaemia, hyperammonaemia, homocitrullinuria (HHH) syndrome who presented with neurological deterioration after an intercurrent infection. Hyperammonaemia, coagulopathy and moderate hypertransaminasaemia were detected on hospital admission. Severe hepatocellular necrosis with hypertransaminasaemia (aspartate aminotransferase 20 000 UI/L, alanine aminotransferase 18 400 UI/L) and coagulopathy (PT < 5%) rapidly developed within few days, prompting evaluation for liver transplantation. A protein-restricted diet and arginine supplementation were immediately started, with a rapid improvement of the patient's neurological conditions and normalization of liver function tests and blood ammonia. The diagnosis of HHH syndrome was based on the presence of the typical metabolic abnormalities. Molecular analysis of the *SLC25A15* gene showed that the patient was heterozygous for two novel mutations (G113C and M273K). The diagnosis of HHH syndrome should be considered in patients with fulminant hepatitis-like presen-

tations. Early identification and treatment of these patients can be life-saving and can avoid liver transplantation.

Introduction

The HHH (hyperornithinaemia, hyperammonaemia, homocitrullinuria) syndrome (McKusick 238970) is a rare autosomal recessive disorder due to defective activity of the mitochondrial carrier that transports ornithine across the inner mitochondrial membrane (Hommes et al 1982; Valle and Simell 2001). The carrier defect results in cytoplasmic ornithine accumulation with intramitochondrial ornithine depletion, causing a secondary urea cycle derangement. Homocitrullinuria, a biochemical marker of the disease, probably results from transcarbamoylation of lysine. Mutations in the solute carrier gene *SLC25A15*, encoding the ornithine transporter ORNT1, have been detected in patients with HHH syndrome (Camacho et al 1999).

The clinical manifestations of the syndrome and the age at onset are variable and range from protein-rich food intolerance, vomiting and lethargy to neurological signs such as seizures, coma, progressive spastic paraparesis, and mental retardation (Valle and Simell 2001). Moderate liver involvement has occasionally been described.

We report a patient with HHH syndrome who presented with fulminant liver failure and coagulopathy. The molecular characterization of this patient showed two novel mutations in the *SLC25A15* gene.

Case report

V.O., a 3-year-old Italian boy, was born at term to apparently unrelated healthy parents, originating from the same area

Communicating editor: Rodney Pollitt

Competing interests: None declared

S. Fecarotta · G. Parenti · P. Vajro · A. Zuppaldi · R. Della Casa ·
G. Andria (✉)
Department of Pediatrics, 'Federico II' University, Via S Pansini
5, 80131 Naples, Italy
e-mail: andria@unina.it

M. T. Carbone · A. Correra
Ospedale SS Annunziata, Naples

G. Torre · S. Riva
U.O. Pediatria, Ospedali Riuniti, Bergamo

C. Dionisi-Vici · F. M. Santorelli
Division of Metabolism and Molecular Medicine,
IRCCS—Children's Hospital Bambino Gesù, Rome, Italy

of southern Italy, by Caesarean section because of fetal distress. Birth weight was normal. Medical history was negative except for a moderate aversion to protein-rich food. His neurological development appeared normal, with the exception of a mild speech delay.

At the age of 3 years 6 months, he presented with lethargy during an intercurrent gastrointestinal infection. Hyperammonaemia (171 $\mu\text{mol/L}$; reference value of our laboratory $<50 \mu\text{mol/L}$) and moderate hypertransaminasaemia (aspartate aminotransferase, AST, EC 2.6.1.1: 79 UI/L, normal range 15–55; alanine aminotransferase, ALT, EC 2.6.1.2: 224 UI/L, normal range 5–45) were detected on hospital admission. Physical examination showed a liver margin 1 cm below the right costal edge without jaundice or splenomegaly.

His clinical course was characterized during the following four days by rapidly progressing hepatocellular necrosis with severe hypertransaminasaemia (AST and ALT peaking at 20000 UI/L and 18400 UI/L respectively, on day 5) and moderate to severe coagulopathy: PT ranged from 48% (day 2) to $<5\%$ (day 5) (normal range 70–120); APTT from 54 s (day 2) to below detection limits (day 5) (normal range 26–44); INR from 1.88 (day 3) to below detection limits (day 5) (normal range 0.8–1.3). On day 3, serum albumin (3.9 g/dl) was in the normal range. Blood cell count and screenings for EBV, CMV, adenovirus, HSV 1 and 2, hepatitis A, B, C and anti-nuclear (ANA), anti-mitochondrial (AMA), anti-smooth muscle (SMA) autoantibodies were all negative or normal. An abdominal ultrasound revealed mild increase of liver size with diffuse hyperechogenicity. On the basis of the clinical and biochemical data, liver transplantation was considered as an emergency therapeutic option and the patient was included on a high-priority list. Therapy with parenteral vitamin K was started, as well as plasma infusions, partially correcting coagulopathy (PT 33%, INR 2.05, APTT 47.8 s on day 5).

Metabolic tests for disorders of the urea cycle and amino acid metabolism were performed and showed elevated blood concentrations of ornithine, homocitrullinuria and elevated orotic acid concentrations in urine samples (Table 1). A GC-MS analysis of urinary organic acids showed a mild increase of methylmalonic acid (29 mmol/mol creatinine; normal range not detectable), ethylmalonic acid (108 mmol/mol

creatinine; normal range 1.7–14.6) and methylcitric acid (32 mmol/mol creatinine; normal range 0.5–5.3) (Hoffmann 1996). Owing to the presence of hyperammonaemia, hyperornithinaemia and homocitrullinuria, a diagnosis of HHH syndrome was proposed.

Before the results of the metabolic tests were available, a defect of the urea cycle was suspected, based on the clinical history of protein-rich food aversion and on the acute onset of hyperammonaemia during an intercurrent infection. An emergency protocol for the treatment of acute hyperammonaemia with intravenous arginine supplementation and a protein-restricted diet (0.6 g/kg per day) was immediately started. After approximately 24 h of this regimen, blood ammonia normalized (41 $\mu\text{mol/L}$); blood ammonia monitoring during the following days showed values at the upper limits of our laboratory (range 47–55 $\mu\text{mol/L}$). INR was 1.24 at day 9. A progressive decrease of hypertransaminasaemia was observed over a period of approximately 45 days (AST was 77 U/L and ALT 68 U/L on day 45). Owing to the rapid improvement of neurological conditions and the correction of biochemical abnormalities, the need for liver transplantation was reconsidered.

Long-term therapy with oral arginine supplementation (250 mg/kg/day) was started, allowing an increased protein intake (1 g/kg/day), without further metabolic dysfunction.

Molecular analysis of the *SLC25A15* gene was performed by PCR amplification of genomic DNA extracted from peripheral leukocytes with primers corresponding to intronic sequences flanking the individual exons of the *SLC25A15* gene and direct sequencing of the single exons using an automated ABI Prism 377 sequencing apparatus. Molecular analysis revealed that the patient was compound heterozygous for two novel mutations: c.496G>T in exon 3, resulting in the change of a glycine residue at codon 113 into a cysteine (G113C), and c.977T>A in exon 6, resulting in the change of a methionine at codon 273 into a lysine (M273K). The former mutation was also present in heterozygous state in the mother, whereas the M273K allele was inherited from the father. Both mutations affect residues conserved in orthologous proteins and they were not detected in 200 Italian control chromosomes.

Table 1 Metabolic investigations

	Day 4	Day 20	Day 45	7 months	Normal range
Blood ammonia ($\mu\text{mol/L}$)	141	47	63	34	<50
Ornithinaemia ($\mu\text{mol/L}$)	852	344	368	515	30–130
Homocitrullinuria ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)	34	10.3	6.4	9.5	Traces
Urinary orotic acid ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)	42.8			2.0	<11

Quantitative amino acids analysis in plasma and urine was performed by chromatography, using a Beckman amino acid analyser under standard conditions

Orotic acid in urine was determined by a colorimetric assay according to Adachi et al (1963)

Discussion

Most inherited defects of the urea cycle may present with variable liver disease, ranging from mild hypertransaminasaemia to acute liver failure (Clayton 2002). However, severe liver failure has never been reported in the HHH syndrome. The spectrum of clinical manifestations of HHH syndrome is wide and ranges from severe neonatal forms to milder cases with adult-onset presentation (Valle and Simell 2001). There are only a few reports in the literature of liver involvement, sometimes in association with mild coagulopathy and reduced clotting factors VII and X. The original patient reported by Shih and colleagues (1969) presented with a moderate increase of AST level. There was no evidence of hepatomegaly or coagulation abnormality. Gjessing and colleagues (1986) reported a case of a boy with the HHH syndrome who developed hepatomegaly and alterations of liver tests. Dionisi Vici and colleagues (1987) reported two patients with hypertransaminasaemia, one of whom showed deficiency of clotting factors VII and X. Smith and colleagues (1992) reported a case with slightly prolonged partial thromboplastin time (PTT), normal prothrombin time (PT), defect of several clotting factors, and a mild abnormality of liver tests (both below 200 U/L), first discovered during a pre-operative evaluation for tonsillectomy. However, in all instances liver involvement was mild and different from that observed in our patient, which was consistent with a fulminant hepatitis-like presentation.

Molecular data do not help explain the clinical variability in the HHH syndrome. In most of the reported patients in whom a molecular analysis was performed, including our case, private mutations were found, not allowing clear genotype–phenotype correlations. In this respect, it should be noted that, although both parents originate from a restricted geographic area, each of them carries a different mutation of the *SLC25A15* gene.

The pathogenesis of such a severe liver involvement is not clear. The reported findings of abnormal excretion of urinary organic acids (lactic acid, 2- and 3-hydroxybutyric acids, Krebs cycle intermediates) and of moderate lactic acidemia with elevated plasma alanine (Korman et al 2004) suggest that a mitochondrial dysfunction might play a role in the pathogenesis of HHH syndrome, explaining the combination of encephalopathy with liver disease. Ultrastructural studies have shown enlarged mitochondria with bizarre shape and structure in liver, cultured skin fibroblasts and muscle (Haust et al 1981, 1996; Salvi et al 2001).

The mild increase of methylmalonic, ethylmalonic and methylcitric acids in our patient may be consistent with the hypothesis of a mitochondrial dysfunction.

Severe and progressive liver failure requires a prompt diagnosis of the underlying cause, as well as rapid decisions about therapeutic strategies. In our case, liver transplantation

was considered in the first five days after hospital admission, based on the rapidly deteriorating liver function which suggested massive hepatocellular necrosis. However, a rapid diagnosis of HHH syndrome proved of great importance in establishing the appropriate treatment with a protein-restricted diet and arginine supplementation, according to standard protocols, which was effective in reducing blood ammonia and avoiding the need for liver transplantation.

It is therefore of crucial importance to suspect an in-born error of metabolism in patients with rapidly progressive liver disease, particularly when associated with neurological signs, and to perform screening analyses for metabolic diseases. Early identification and treatment of these patients can be life saving.

Acknowledgements The molecular analysis of the patient was supported in part by grants from the Italian Ministry of Health (Ricerca corrente and finalizzata to C.D.V.).

References

- Adachi T, Tanimura A, Asahina M (1963) A colorimetric determination of orotic acid. *J Vitaminol (Kyoto)* **127**: 217–226.
- Camacho JA, Obie C, Biery B, et al (1999) Hyperornithinaemia, hyperammonaemia, homocitrullinuria syndromes caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter. *Nature Genetics* **22**: 151–158.
- Clayton PT (2002) Inborn errors presenting with liver dysfunction. *Semin Neonatol* **7**(1): 49–63.
- Dionisi Vici C, Bachmann C, Gambarara M, Colombo JP, Sabetta G (1987) Hyperornithinaemia–hyperammonaemia–homocitrullinuria: low creatine excretion and effect of citrulline, arginine or ornithine supplement. *Pediatr Res* **22**: 364–367.
- Gjessing LR, Lunde HA, Undrum T, Broch H, Alme A, Lie SO (1986) A new patient with hyperornithinaemia, hyperammonaemia and homocitrullinuria treated early with low-protein diet. *J Inher Metab Dis* **9**: 186–192.
- Haust MD, Gatifield PD, Gordon BA (1981) Ultrastructure of hepatic mitochondria in a child with hyperornithinaemia, hyperammonaemia and homocitrullinuria. *Hum Pathol* **12**: 212–222.
- Haust MD, Dewar RA, Gatifield DP, Gordon BA (1996) Hyperornithinaemia–hyperammonaemia–homocitrullinuria (HHH)-syndrome. Ultrastructural changes of mitochondria in cultured dermal fibroblasts of three patients. *Pathol Res Pract* **192**(3): 271–280.
- Hommes FA, Ho CK, Roesel RA, Coryell ME, Gordon BA (1982) Decreased transport of ornithine across the inner mitochondrial membrane as a cause of hyperornithinaemia. *J Inher Metab Dis* **5**: 41–47.
- Hoffmann GF (1996) Organic acid analysis. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, eds. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. London: Chapman and Hall Medical, 31–49.
- Korman SH, Kanazawa N, Abu-Libdeh B, Gutman A, Tsujino S (2004) Hyperornithinaemia, hyperammonaemia and homocitrullinuria syndrome with evidence of mitochondrial dysfunction due to a novel *SLC25A15* (ORNT1) gene mutation in a Palestinian family. *J Neurol Sci* **218**: 53–58.
- Salvi S, Santorelli MD, Bertini E, et al (2001) Clinical and molecular findings in hyperornithinaemia–hyperammonaemia–homocitrullinuria syndrome. *Neurology* **57**: 911–914.

- Shih VE, Efron ML, Moser HW (1999) Hyperornithinaemia, hyperammonaemia and homocitrullinuria. A new disorder of amino acid metabolism associated with myoclonic seizures and mental retardation. *Am J Dis Child* 117: 83–91.
- Smith L, Lambert MA, Brochu P, Jasmin G, Qureshi IA, Seidman EG (1992) Hyperornithinaemia, hyperammonaemia, homocitrullinuria (HHH) syndrome: presentation as acute liver disease with coagulopathy. *JPGN* 15: 431–436.
- Valle D, Simell O (2001) The hyperornithinaemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds; Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, assoc. eds; *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 1857–1895.

Growth hormone deficiency in a patient with lysinuric protein intolerance

Valentina Esposito · Teresa Lettiero · Simona Fecarotta ·
Gianfranco Sebastio · Giancarlo Parenti ·
Mariacarina Salerno

Received: 14 October 2005 / Accepted: 20 April 2006 / Published online: 15 June 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract

Introduction Lysinuric protein intolerance (LPI; MIM 222700) is a rare, autosomal recessive metabolic disorder caused by mutations in the *SLC7A7* gene, which encodes the light chain of the cationic amino acids (CAA) transporter y⁺. The clinical presentation of LPI includes gastrointestinal symptoms, failure to thrive, episodes of coma, hepatosplenomegaly and osteoporosis. However, other findings have also been reported, and these suggest a multisystem involvement.

Discussion We report a girl with confirmed LPI who presented with severe short stature that was unresponsive to adequate LPI treatment. The girl was found to have a classic growth hormone deficiency (GHD) and responded well to growth hormone (GH) replacement therapy.

Conclusion While it is not known whether the mechanisms involved in the GHD of our patient are related to LPI, this case suggests that GH/IGF-I axis should be investigated in LPI children with persistent growth failure.

Keywords Short stature · Growth hormone deficiency · Lysinuric protein intolerance

Abbreviations

ACTH Adrenocorticotrophic hormone
CAA Cationic amino acids
GH Growth hormone

GHD Growth hormone deficiency
IGF-I Insulin-like growth factor-I
LPI Lysinuric protein intolerance
TRH Thyrotropin releasing hormone

Introduction

Lysinuric protein intolerance (LPI; MIM 222700) is a rare, autosomal recessive metabolic disorder caused by the defective transport of the cationic amino acids (CAA) lysine, arginine and ornithine at the basolateral membrane of renal tubular cells and enterocytes. The disease is caused by mutations in the *SLC7A7* gene, which encodes the light chain of CAA transporter y⁺ [3, 14].

Metabolic derangement is characterized by decreased plasma levels and increased renal clearance of CAA, orotic aciduria and dysfunction of the urea cycle, leading to hyperammonemia [10].

The clinical presentation of LPI includes gastrointestinal symptoms, such as vomiting and diarrhoea, failure to thrive, episodes of coma, hepatosplenomegaly and osteoporosis. Additional manifestations such as renal failure, erythroblastophagocytosis in the bone marrow and alveolar proteinosis are suggestive of multisystem involvement. They are less clearly related to the metabolic derangement, but significantly affect the prognosis of the patients [8].

In LPI, growth failure and delayed skeletal maturation have been reported as a consequence of protein malnutrition. However slightly subnormal or low-normal final height can be achieved with therapy [10]. Here we report on a 12-year-old LPI patient with severe short stature (unresponsive to treatment) in whom growth hormone deficiency (GHD) was demonstrated by endocrine evaluation.

V. Esposito · T. Lettiero · S. Fecarotta · G. Sebastio · G. Parenti ·
M. Salerno (✉)
Department of Pediatrics, Federico II University of Naples,
Via S. Pansini 5-80131,
Naples, Italy
e-mail: salerno@unina.it

Table 1 Plasma concentration and renal clearance (normal range in parenthesis) of amino acids and urinary excretion of orotic acid at the time of LPI diagnosis (3.5 years of age)

	Plasma $\mu\text{mol/L}$	Renal clearance of amino acids ($\text{mL/min}/1.73 \text{ m}^2$)	Urinary excretion of orotic acid ($\mu\text{mol}/\text{mmol}/\text{creatinine}$)
Ornithine	20 (27–86)	1.5 (0.2–0.8)	—
Lysine	45 (71–151)	38 (0.3–2.4)	—
Arginine	23 (23–86)	1.9 (0.15–1.2)	—
Orotic acid	—	—	39 (<11)

Case report

The patient, a girl, was the first child of unrelated healthy parents, born at term after an uneventful pregnancy. Birth weight was 2.9 kg (25th percentile) and length was 49 cm (50th percentile). At 3.5 years of age the girl was referred to our department because of failure to thrive and a history of vomiting and protein-rich food aversion.

Upon physical examination she was found to be an alert girl with thin hair and hepatosplenomegaly; her weight was 10 kg (below the 3rd percentile) and height was 89.5 cm

(3rd percentile; SDS -1.8) [12, 13]. The diagnosis of LPI was confirmed by decreased plasma levels, increased renal clearance of CAA and increased urinary orotic acid (Table 1) [10]. *SLC7A7* gene sequencing revealed homozygosity for the W242X mutation [11].

Soon after diagnosis, the patient started a low-protein diet (1.5 g/kg/day) and oral citrulline supplementation (150 mg/kg/day) [10]. Despite good compliance with therapy, poor growth persisted, particularly in regard to height (Fig. 1). Blood cell count, electrolyte levels, renal and liver function tests, glucose level and urine analysis were normal. Common causes of growth failure such as thyroid dysfunction, coeliac disease and Turner syndrome were excluded by appropriate investigations.

At 10 years of age the patient developed dysfunction of the proximal tubules leading to excessive urinary loss of glucose, bicarbonate, calcium and phosphate. Biochemical analysis showed glycosuria (1 g/day), hypophosphatemia (0.96 mmol/L), reduced tubular reabsorption of phosphate (80%), hypercalciuria (10 mg/kg/day) and metabolic acidosis (pH 7.3; base excess -6). Serum parathyroid hormone level, calcium serum concentration and glomerular filtration rate, evaluated by creatinine clearance, were all normal. A renal histology was performed and did not demonstrate any histopathological alteration. An appropriate therapy for proximal tubular disease was started with sodium bicarbonate, phosphate and vitamin D. This allowed for an adequate replacement of renal losses, which was followed by an increase in weight, however there was no improvement in linear growth.

At 12 years of age the patient was still prepubertal with a proportionate, severe short stature: height was 117 cm (below the 3rd percentile; SDS -4.6), weight was 21.5 kg (below the 3rd percentile) with a normal body mass index. Her height age was 6.5 years. Growth velocity was 2 cm/year (below the 3rd percentile) and bone age consequently severely delayed, being 7 years according to Greulich and Pyle method [5]. Because of persistent growth failure, despite a good caloric intake (80–90 kcal/kg/day), a sufficient protein amount (1.2 g/kg/day) and an adequate replacement therapy of tubular losses, GH secretion was investigated. At that time plasma arginine and lysine levels

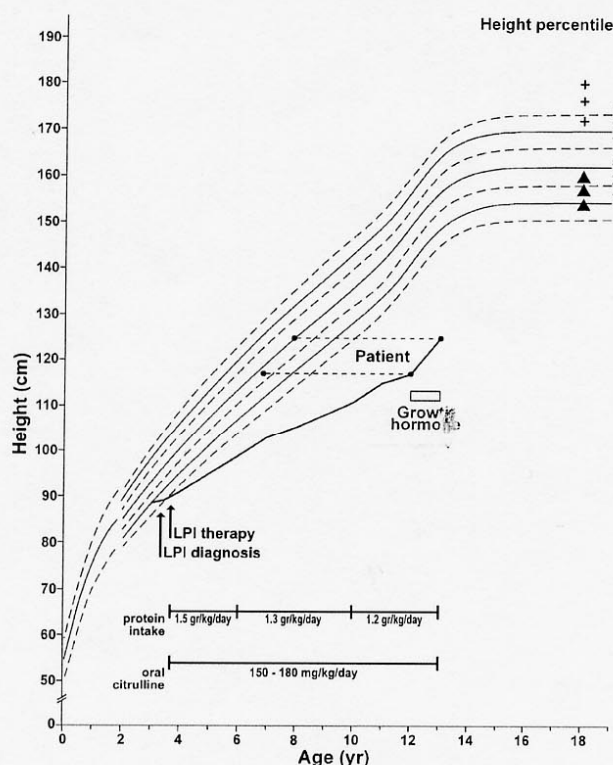


Fig. 1 Growth chart of the patient, plotted by Tanner and Whitehouse female percentiles. The time when LPI therapy and GH treatment were started is indicated. Protein intake and oral citrulline supplementation through the years are illustrated. The horizontal dotted lines show the degree of delay in bone age. In the same growth chart of our LPI patient, the final heights of other subjects with LPI followed at our department are represented by plus signs (boys) and by triangles (girls)

Table 2 Endocrine evaluation of the patient

	Before GH therapy	After 12 months GH therapy
CA (years)	12	13
BA (years)	7	8
Height (cm) (percentile)	117 (<3%)	125 (<3%)
Weight (kg) (percentile)	21.5 (<3%)	25.6 (<3%)
BMI (kg/m ²) (percentile)	16 (10–25%)	16 (10%)
GH peak at arginine ^a (μg/L)	6.4	
GH peak at clonidine ^a (μg/L)	2.7	
IGF-I ^b (μg/L) (SDS)	95 (−1.5)	379 (−0.6)
TSH ^c (μU/mL), Basal	2.6	2.7
Peak after TRH	18	
Free T4 ^c (ng/dL)	1.1	1.0
8 a.m. cortisol ^c (μg/dL), Basal	18	19
Peak after ACTH	32	
FSH ^c (mU/mL)	2.1	0.6
LH ^c (mU/mL)	0.1	0.1
Estradiol ^c (pg/mL)	<20	<20

BA Bone age, CA chronological age, BMI body mass index

^a Normal GH peak after arginine or clonidine: ≥ 10 μg/L

^b IGF-I normal values for CA and prepubertal stage: 97–699 and 90–485 μg/L respectively

^c Normal range (prepubertal): TSH 0.3–4.7 μU/mL; free T4: 0.7–1.6 ng/dL; 8 a.m. cortisol: 5–20 μg/dL; FSH: 1–4.2 mU/mL; LH: 0.02–0.2 mU/mL; estradiol: 5–20 pg/mL

were in the low-normal range, at 30–36 μmol/L and 77–85 μmol/L respectively.

GH peak serum level after two provocative tests (arginine 0.5 g/kg iv and clonidine 0.15 mg/m² orally) and serum insulin-like growth factor I (IGF-I) were low (Table 2). A thyrotropin-releasing hormone (TRH 0.2 mg iv) and an adrenocorticotrophic hormone (ACTH 0.25 mg iv) stimulation test revealed normal pituitary-thyroid and adrenal function; FSH, LH and estradiol levels were prepubertal.

Magnetic resonance of the hypothalamo-pituitary area revealed no abnormalities. Daily subcutaneous GH treatment was started at a dose of 35 μg/kg/day. After 1 year of GH therapy, the patient was still prepubertal and presented a significant acceleration of growth velocity (8 cm/year; above the 97th percentile) with a regular maturation of bone age.

Discussion

Our patient presented progressive slowing of growth, delayed skeletal maturation, reduced IGF-I and reduced GH serum levels after two provocative tests. On the basis of

these findings, GHD was diagnosed and catch-up growth resulted as an effect of GH replacement therapy at standard dosage [15].

GH secretion has already been studied in LPI subjects, but our patient is the first case with documented GHD. Awrich et al. [2] reported normal GH secretion in a girl with LPI before the beginning of an adequate oral amino acid supplementation; this treatment resulted in an improvement of growth. GH secretion was studied also by Goto et al. [4] in two other patients affected with LPI and growth failure. The authors were unable to document GH deficiency because the response to one of the provocative tests for GH was above 10 μg/L; however an improvement in growth velocity after 8 months of oral administration of arginine was documented.

In the cohort of LPI patients treated in our department [11], adequate therapy resulted in normal linear growth (Fig. 1) in all but two patients, one of whom was affected by chronic renal failure [8] and the other by severe respiratory involvement [9].

GH/IGF-I axis may be influenced by several factors, including malnutrition and renal failure; however these conditions are associated with reduced IGF-I values and increased GH levels, thus indicating peripheral GH resistance [6]. This was not the case of our patient, in whom both IGF-I and GH levels were low. In addition, when GHD was diagnosed, the patient had a normal body mass index and did not show signs of malnutrition; at that time caloric intake was adequate and protein intake was in the low-normal range for age and weight. Moreover, glomerular filtration rate was normal and tubular electrolyte losses were replaced by adequate treatment.

These results suggest that our patient is affected by LPI and idiopathic GH deficiency; however a possible pathogenetic linkage between the two conditions might be hypothesized. It is well known that specific nutritional factors, including amino acids such as lysine and arginine, can stimulate GH secretion [1, 7], and insufficient response to some of these agents has been used to define GH deficiency. The hypothesis that persistent low-normal levels of arginine and lysine during LPI therapy may lead to impaired GH secretion is intriguing. However any relationship to GHD remains speculative. Further investigations in a larger number of patients are needed to clarify whether a possible pathogenetic linkage may exist between LPI and impairment of GH secretion; alternatively the GHD found in our patient might represent an unrelated, incidental finding.

In conclusion, while it is not known whether or not the mechanisms involved in the GHD of our patient are related to LPI, this case adds a new feature in this intriguing disease and suggests that GH/IGF-I axis should be investigated in LPI children with persistent growth failure.

References

- Alba-Roth J, Muller OA, Schopohl J, von Werder K (1988) Arginine stimulates growth hormone secretion by suppressing endogenous somatostatin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 67:1186–1189
- Awrich AE, Stackhouse WJ, Cantrell JE, Patterson JH, Rudman D (1975) Hyperdibasicaminoaciduria, hyperammonemia, and growth retardation: treatment with arginine, lysine, and citrulline. *J Pediatr* 87:731–738
- Borsani G, Bassi MT, Sperandeo MP, De Grandi A, Buoninconti A, Riboni M, Manzoni M, Incerti B, Pepe A, Andria G, Ballabio A, Sebastio G (1999) SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat Genet* 21:297–301
- Goto I, Yoshimura T, Kuroiwa Y (1984) Growth hormone studies in lysinuric protein intolerance. *Eur J Pediatr* 141:240–242
- Greulich WW, Pyle SI (1969) *Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist*, 2nd edn. Stanford University Press, Stanford
- Grottoli S, Gasco V, Ragazzoni F, Ghigo E (2003) Hormonal diagnosis of GH hypersecretory states. *J Endocrinol Invest* 26 (10 Suppl):27–35
- Knopf RF, Conn JW, Fajanss, Floyd JC, Guntzsch EM, Rull JA (1965) Plasma growth hormone response to intravenous administration of amino acids. *J Clin Endocrinol Metab* 25: 1140–1144
- Parenti G, Sebastio G, Strisciuglio P, Incerti B, Pecoraro C, Terracciano L, Andria G (1995) Lysinuric protein intolerance characterized by bone marrow abnormalities and severe clinical course. *J Pediatr* 126:246–251
- Santamaria F, Brancaccio G, Parenti G, Francalanci P, Squitieri C, Sebastio G, Dionisi-Vici C, D'Argenio P, Andria G, Parisi F (2004) Recurrent fatal pulmonary alveolar proteinosis after heart-lung transplantation in a child with lysinuric protein intolerance. *J Pediatr* 145:268–272
- Simell O (2001) Lysinuric protein intolerance and other cationic aminoacidurias. In: Scriver CH, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *Metabolic and molecular bases of inherited diseases*. McGraw-Hill, New York, pp 4933–4956
- Sperandeo MP, Bassi MT, Riboni M, Parenti G, Buoninconti A, Manzoni M, Incerti B, Larocca MR, Di Rocco M, Strisciuglio P, Dianzani I, Parini R, Candito M, Endo F, Ballabio A, Andria G, Sebastio G, Borsani G (2000) Structure of the SLC7A7 gene and mutational analysis of patients affected by lysinuric protein intolerance. *Am J Hum Genet* 66:92–99
- Tanner J, Whitehouse R (1976) Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity and weight velocity and stages of puberty. *Arch Dis Child* 51:170–179
- Tanner J, Whitehouse R, Takaishi M (1965) Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity and weight velocity: British children 1965. *Arch Dis Child* 41:613–635
- Torrents D, Mykkanen J, Pineda M, Feliubadalo L, Estevez R, de Cid R, Sanjurjo P, Zorzano A, Nunes V, Huoponen K, Reinikainen A, Simell O, Savontaus ML, Aula P, Palacin M (1999) Identification of SLC7A7, encoding y+LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat Genet* 21:293–296
- Wilson TA, Rose SR, Cohen P, Rogol AD, Backeljauw P, Brown R, Hardin DS, Kemp SF, Lawson M, Radovick S, Rosenthal SM, Silverman L, Speiser P (2003) Update of guidelines for the use of growth hormone in children: the Lawson Wilkins Pediatric Endocrinology Society Drug and Therapeutics Committee. *J Pediatr* 143:415–421

UPDATE ARTICLE

ARTICOLO DI AGGIORNAMENTO

Hematological manifestations in inborn errors of metabolism

Manifestazioni ematologiche delle malattie metaboliche ereditarie

S. FECAROTTA, G. ANDRIA

Department of Pediatrics, "Federico II" University of Naples, Italy

Summary

Inborn errors of metabolism present with clinical manifestations affecting various organs. Hematological signs are not common but when noticed, in combination with other manifestations suggestive of an inborn error of metabolism, can be of great help to start a diagnostic work-up and lead to early treatment. The presence of bone marrow foamy cells suggest a lysosomal storage disease. Anemia and thrombocytopenia or pancytopenia can be detected in lysosomal storage disorders, organic acidurias and mevalonic acidemia. Chronic neutropenia is a constant finding in glycogenosis type Ib. Hemophagocytic lymphohistiocytosis has been reported in lysinuric protein intolerance. Macrocytic anemia has been observed in inherited disorders of folate and cobalamin absorption, transport or metabolism, and in congenital orotic aciduria. Sideroblastic anemia is a feature of thiamine-responsive megaloblastic anemia and Pearson syndrome; haemolytic anemia may be observed in Wilson disease. Acanthocytosis has been reported in abetalipoproteinemia. Thrombophilia is associated with hyperhomocysteinemia due to different enzymatic defects.

Key words

Inborn errors of metabolism •
Metabolic diseases • Hematology
• Hematologic manifestations •
Hematologic complications

Parole chiave

Errori congeniti del metabolismo
• Malattie metaboliche ereditarie
• Ematologia • Manifestazioni
ematologiche • Complicanze
ematologiche

Received: August 20, 2006

Correspondence:

Prof. Generoso Andria
Dipartimento di Pediatria
Università "Federico II"
Napoli, Italy
Tel. +39 081 7462673
Fax +39 081 7463116
E-mail: andria@unina.it

Lecture at the Annual Meeting
"XXXII Congresso Nazionale Asso-
ciazione Italiana Ematologia Onco-
logia Pediatrica", Haematologica
2005;90:23-27

Riassunto

Le malattie metaboliche ereditarie sono caratterizzate da manifestazioni cliniche che dipendono dal coinvolgimento di vari organi e apparati. Le manifestazioni ematologiche sono raramente presenti, ma quando evidenti in associazione ad altri segni e sintomi suggestivi di una malattia metabolica, possono indirizzare il sospetto diagnostico, permettendo talora un precoce intervento terapeutico.

La presenza di cellule schiumose midollari o periferiche può suggerire la diagnosi di malattia da accumulo lisosomiale. Anemia e trombocitopenia o pancitopenia sono descritte in alcune malattie da accumulo lisosomiale, nelle organicoacidemie e nella acidemia mevalonica. Una neutropenia cronica isolata è una caratteristica costante nella glicogenosi Ib. Una sindrome da attivazione macrofagica è riportata nell'intolleranza alle proteine con lisinuria. Un'anemia macrocitica ad esordio precoce può suggerire il sospetto diagnostico di un'anomalia ereditaria dell'assorbimento, trasporto o metabolismo di folati e cobalamina, oltre che una diagnosi di oroticoaciduria congenita. Un'anemia sideroblastica è una caratteristica dell'anemia megaloblastica responsiva alla tiamina e della sindrome di Pearson. Un'anemia emolitica può essere il sintomo di esordio di alcune malattie metaboliche ereditarie come la malattia di Wilson o di Wolman. La presenza di acantocitosi, in associazione a sintomi neurologici è una caratteristica della abetalipoproteinemia. Manifestazioni trombofiliche sono associate a iperomocisteinemia, causata da difetti enzimatici differenti.

Inborn errors of metabolism (IEM) are rare diseases but their total incidence, as a group, is not negligible. Their clinical manifestations affect various organs and systems and require specific care from different specialists. Hematological signs are not common but when noticed, in combination with other manifestations suggestive of an inborn error of metabolism, can be of great help to start a diagnostic work-up and lead to early treatment¹. We will discuss the haematological involvement in IEM, listed on the basis of the main haematological sign (Tab. I).

Tab. I. (continua)

Main haematological sign	IEM	Main associated symptoms	Other hematological signs
Foamy cells and/or vacuolated lymphocytes	Gaucher disease	Hepatosplenomegaly, bone and pulmonary involvement, CNS involvement (in some cases)	Anemia and thrombocytopenia, pancytopenia
	Niemann-Pick disease type A	Hepatosplenomegaly, hypersplenism, prolonged jaundice, pulmonary involvement, neurological symptoms	Anemia and thrombocytopenia, sea-blue hystocytosis
	Niemann-Pick disease type B	Hepatosplenomegaly, hypersplenism, pulmonary involvement	Anemia and thrombocytopenia, sea-blue hystocytosis
	Niemann-Pick disease type C	Hepatosplenomegaly, hypersplenism, prolonged neonatal jaundice, pulmonary involvement, neurological progressive involvement, sopranuclear ophthalmoplegia	Anemia and thrombocytopenia, sea-blue hystocytosis
Peripheral vacuolated granulocytes	Mucopolysaccharidoses	Skeletal dysostosis, variable neurological involvement, hepatosplenomegaly, macroglossia, ocular abnormalities, heart involvement, respiratory involvement	
	Galactosialidosis	Skeletal dysostosis, progressive neurological manifestations, hepatosplenomegaly, ocular abnormalities, angiokeratoma, heart involvement, renal involvement	Anemia and thrombocytopenia
	Wolman disease	Severe diarrhea and malnutrition, hepatosplenomegaly, progressive mental deterioration, adrenal calcifications	Anemia
	Triglyceride storage disease	Congenital ichthyosis, variable neurological involvement, skeletal muscle involvement, various organs involvement	
Pancytopenia Anemia Thrombocytopenia	Methylmalonic-, propionic-, isovaleric aciduria	Metabolic decompensation (vomiting, acidosis, hyperammonemia, neurological symptoms), psychomotor delay, various complications	
	Mevalonic aciduria	Dysmorphic features, neurological involvement, cataract and blue sclerae, gastrointestinal symptoms, hepatosplenomegaly, arthralgias, rash	Leukocytosis
Neutropenia	Type Ib-glycogen storage disease	Hypoglycemia, hyperlactic-acidemia, dyslipidemia, hyperuricemia, liver enlargement, kidney involvement	

Tab. I. (*segue*)

Main haematological sign	IEM	Main associated symptoms	Other hematological signs
Macrophagic activation syndrome	Lysinuric protein intolerance	Hyperammonemia, hepatosplenomegaly, gastrointestinal symptoms, failure to thrive, renal involvement, pulmonary alveolar proteinosis, pancreatitis	Thrombocytopenia, anemia, leukopenia
Megaloblastic anemia	Inerslund-Grasbeck syndrome	Proteinuria, neurological symptoms	Pancytopenia
	Congenital deficiency of intrinsic factor	Neurological symptoms, jaundice	
	Congenital transcobalamin II deficiency	Neurological symptoms, agammaglobulinemia, atrophy of the intestinal mucosa	
	Hyperhomocysteinemia due to complementation defects type E and G	Neurological symptoms	Thrombotic complications
	Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (Cbl C, Cbl D, cbl F)	Neurological symptoms, developmental delay, metabolic decompensation, renal failure	Thrombotic microangiopathy, haemolytic-uremic syndrome, pancytopenia
Sideroblastic anemia	Orotic aciduria	Neurological symptoms, crystalluria and urinary obstruction	
	Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome	Diabetes mellitus, sensorineural deafness	
	Pearson marrow-pancreas syndrome	Exocrine pancreatic dysfunction, metabolic acidosis, lactic acidosis, insulin dependent diabetes mellitus	Variable neutropenia and thrombocytopenia
Haemolytic anemia	Wilson disease	Hepatic involvement, renal involvement, neurological symptoms, eye abnormalities (Kayser-Fleischer rings), fulminant liver failure	
Acanthocytosis	Abetalipoproteinemia	Fat intolerance, progressive spinocerebellar ataxia, peripheral neuropathy, retinitis pigmentosa	
Thrombophilic complications	Homocystinuria type I	Marfan like features, ectopia lentis, neurological symptoms	
	Methylentetrahydrofolate reductase deficiency	Neurological symptoms	

Bone marrow foamy cells and peripheral vacuolated lymphocytes

Some IEM as lysosomal storage disorders (LSD) show a bone marrow involvement due to infiltration by foamy cells, sometimes leading to the development of anemia and thrombocytopenia combined with a variable degree of hepato-splenomegaly.

LSD are inherited metabolic diseases characterized by the storage into the lysosomes of complex molecules, i.e. glycolipids, gangliosides, mucopolysaccharides, cholesterol due to lysosomal hydrolases deficiency or defect in lysosomal trafficking.

Hematological involvement is easily detected in some disorders as in Gaucher and Niemann-Pick diseases, being characterized by pancytopenia or anemia and thrombocytopenia, combined with hepatomegaly and splenomegaly. The presence of typical cells infiltrating bone marrow and several organs is a consistent finding. *Gaucher disease* (OMIM 230800, 230900, 231000), one of the most common LSD, is caused by the defective activity of the lysosomal enzyme acid beta-glucocerebrosidase, leading to accumulation of glucosylceramide, particularly in cells of the macrophage lineage. Clinical manifestations include anemia, thrombocytopenia and hepatosplenomegaly. Bone disease and lung involvement are also prominent features. In patients with specific genotypes an involvement of central nervous system can occur.

Enzyme replacement therapy² with recombinant enzyme is presently the treatment of choice for non-neurological symptoms of Gaucher disease, leading to an improvement of hematological signs³.

The hallmark of Gaucher disease is the presence in a variety of tissues of lipid-engorged cells with a characteristic appearance at light microscopy: in smears of affected tissues Gaucher cells are about 20 to 100 µm in diameter, contain one or more nuclei and cytoplasm with a striated, fibrillary or tubular pattern presenting the so called "wrinkled tissue paper" or "crumpled silk" appearance. On Romanovsky-stained preparations these cells manifest a characteristic pale blue to gray cytoplasm⁴ (Fig. 1).

Hematological and visceral signs, often similar to Gaucher disease can be recognized in *Niemann-Pick disease* (NPD), especially in type A and B. Bone marrow examination reveals the histochemically characteristic "Niemann-Pick foamy cells" that show peculiar features, and should not be confused with "Gaucher cells". The "Niemann-Pick foamy cell" is 25 to 75 µm in diameter (smaller than the average Gaucher cell), usually has one nucleus, and the cytoplasm is generally filled with lipid droplets or particles, uniform in size, that appear white or empty and give the cell its characteristic foamy appearance. This appearance has been referred to as "mulberry-like" or "honeycomb-like", containing discrete membrane-bound lipid inclusions⁵ (Fig. 2).

NPD type A (OMIM 257200) and *type B* (OMIM 607616) represent allelic disorders caused by muta-

Fig. 1. (A, B) Gaucher disease: Gaucher-cells in the bone marrow.

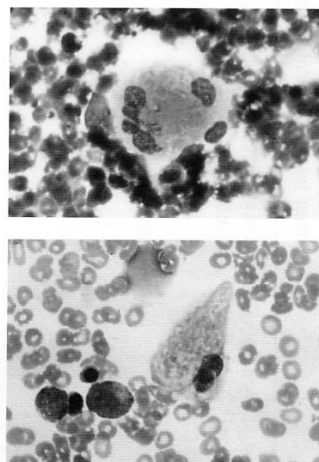
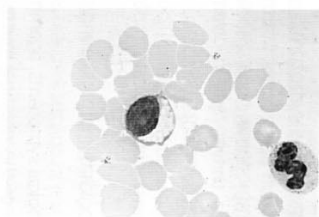


Fig. 2. Niemann-Pick disease type A: vacuolated lymphocytes in the blood smear.



tions of the acid sphingomyelinase (ASM) gene. These two main clinical phenotypes can be distinguished by the involvement or non-involvement of the central nervous system, respectively.

The neurovisceral form, type A, is characterized by a rapid and fatal course within the first years of life. A moderate microcytic anemia, which may be responsive to iron supplementation, and a decreased platelet count occur later in the course of this disease.

In type B storage is restricted to the abdominal viscera and the course is slowly progressive, with patients usually reaching adulthood. At diagnosis patients usually have evidence of mild pulmonary involvement that generally progresses with age. Severely affected patients may have liver involvement leading to life-threatening cirrhosis, portal hypertension and ascites. Clinically significant pancytopenia, due to secondary hypersplenism is rare, but it may require partial or complete splenectomy.

NPD type C (OMIM 257220), is a rare inherited lysosomal disorder characterized by defects in intracellular cholesterol trafficking and homeostasis. It is a genetically heterogeneous disorder due to mutations in the NPC-1 gene in above 90% of cases and to mutations in

the NPC-2 gene in the remaining cases. It is a fatal neurodegenerative disorder, with variable age at onset. The presence of a visceral involvement with hepatomegaly and splenomegaly may occur⁶.

Clinical manifestations of different LSD depend on the organs and tissues where storage occurs and may be characterized by cardiac, renal and visceral involvement, coarse face, skeletal dysostosis, angiokeratoma, ocular abnormalities and neurological manifestations. The identification of foamy cells in the bone marrow or enlarged vacuolated lymphocytes in the peripheral blood smear is of great help to start a diagnostic work-up in LSD. The variable combination of five main features, as mental retardation, visceromegaly, presence of foamy histiocytes or vacuolated lymphocytes, skeletal dysostosis and macular cherry-red spot can help distinguish between the main LSD group⁷.

Apart from Gaucher and NPD, combined or isolated presence of foamy histiocytes and vacuolated lymphocytes have been shown in many different LSD as sialidosis, GM1-gangliosidosis (Fig. 3), alpha-mannosidosis, fucosidosis, aspartylglucosaminuria, mucopolipidosis type II and III, multiple sulphatase deficiency, infantile sialic storage disease, Fabry diseases and few others that are discussed below in more details.

Ultrastructural examination of peripheral lymphocytes in patients with various LSD showed that some disorders (neuronal ceroid-lipofuscinoses, glycogenosis type II, mucopolysaccharidoses and GM1-gangliosidosis) have pathological findings with specific inclusions or vacuoles, while others (juvenile and adult metachromatic leukodystrophies, mucopolipidosis type III, GM2-gangliosidosis and Gaucher disease) do not show such pathological findings⁸.

Ultrastructural studies of leukocytes from patients with *mucopolysaccharidoses* (MPS) demonstrate a variety of membrane-bound inclusions in lymphocytes and larger mononuclear cells⁹. The Gasser lymphocyte (the typical accumulating cell in most mucopolysaccharidoses) shows black-violet inclusions in the centre of intra cytoplasmatic vacuoles with May-Grunwald-Giemsa stain (Fig. 4)¹.

Peripheral blood lymphocytes with membrane-bound fibrillogranular inclusions, or vacuolated peripheral lymphocytes and bone marrow foamy cells¹⁰ have been described also in *galactosialidosis* (Fig. 5).

Fig. 3. GM1-gangliosidosis: foamy histiocytes in the bone marrow.

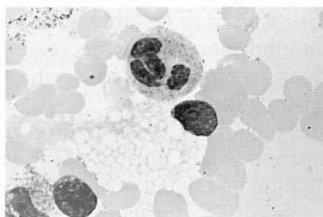


Fig. 4. (A, B) Mucopolysaccharidoses: A. Gasser lymphocyte in the blood smear in MPS type I; B. Gasser lymphocyte in the blood smear in MPS type II.

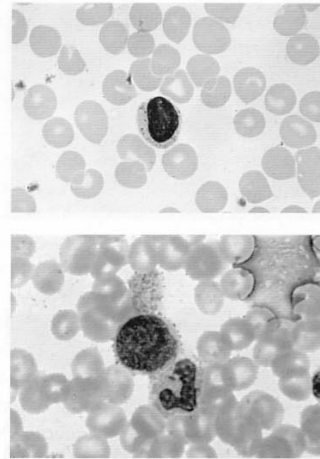
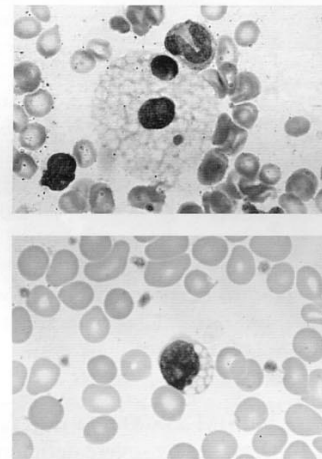


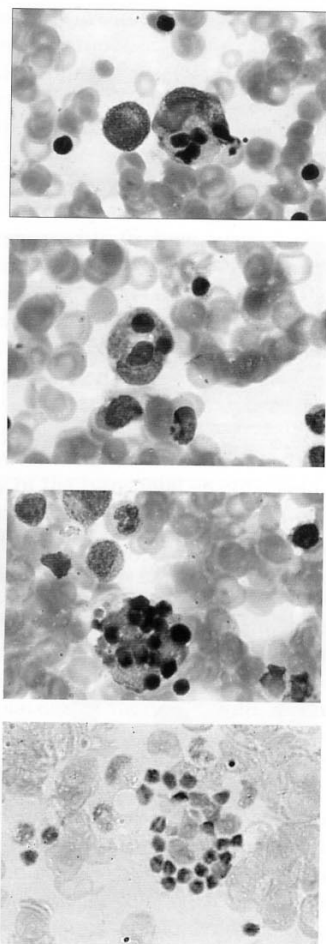
Fig. 5. (A, B) Galactosialidosis: A. foamy histiocyte in the bone marrow; B. vacuolated lymphocyte in the blood smear.



Galactosialidosis is an LSD associated with a combined deficiency of beta-galactosidase and neuraminidase, due to a defect of another lysosomal protein, the protective protein/cathepsin A (PPCA). Three main subtypes are recognized according to age of onset and severity of symptoms, i.e. the early infantile, late infantile and juvenile/adult forms. Clinical features include dysmorphism, skeletal dysplasia, visceromegaly, cardiac and renal involvement, progressive neurological manifestations, ocular abnormalities, and premature death¹¹.

Anemia and thrombocytopenia have occasionally been reported as presenting features in such condition^{12,13}. Foamy histiocytes in bone marrow and vacuolated lymphocytes in peripheral blood smear are often found in

Fig. 6. (A-D) Lysinuric protein intolerance: autophagy of erythroblasts by granuloblasts and clusters of degenerated erythroblast nuclei in the bone marrow.



Wolman disease (OMIM 278000), a rare fatal autosomal recessive LSD caused by severe deficiency of lysosomal acid lipase (LIPA). Severe diarrhea and malnutrition lead to death during infancy. Progressive mental deterioration and hepatosplenomegaly are constant features and may occur early. Adrenal calcification is the hallmark of the disease. The presence of anemia has been reported in some patients¹⁴.

While in *Wolman disease* intra-lysosomal accumulation of cholesterol esters and triglycerides occurs, in *triglyceride storage disease* (OMIM 275630) only triglycerides are stored as cytoplasmatic droplets that are not surrounded by a limiting membrane. The triglyceride storage disease, also known as *Chanarin-Dorfman disease*, is a non-lysosomal, multisystem storage disorder with autosomal recessive inheritance due to a specific defect in the degradation of endocellularly synthesized triglycerides¹⁵. Clinical features are characterized by congenital ichthyosis, variable involve-

ment of the nervous system, skeletal muscle and other organs. Peripheral granulocytes (instead of lymphocytes) are vacuolated, showing typical lipid droplets, known as "Jordan's anomaly". Lipid vacuoles in either granulocytes or cultured cells are pathognomonic and can also be used to identify heterozygous carriers.

Pancytopenia

IEM may show a bone marrow involvement due to a toxic effect of accumulated metabolites, as in the case of *organic acidurias*. Pancytopenia is a typical finding of methylmalonic-, propionic- and isovaleric-acidemia (OMIM 251000, 606054, 243500). These are inborn errors of the intermediate metabolism of several essential amino acids (isoleucine, valine, methionine, threonine) and odd-chain fatty acids, that can show acute metabolic decompensation after feeding in the neonatal period. Clinical features include variable degrees of neurological involvement and various visceral complications. Patients with *organic acidurias* can manifest pancytopenia due to a toxic effect of organic acids on the bone marrow¹⁶. Pancytopenia is also present in *Pearson's syndrome* and in *congenital transcobalamin II deficiency* as discussed below.

In *mevalonic aciduria* (OMIM 251170), an inherited disorder of the cholesterol and non sterol isoprenoid biosynthesis with a multisystemic involvement, hematological signs consist of anemia and thrombocytopenia with leukocytosis and visceromegaly¹⁷.

Neutropenia

Chronic neutropenia is a constant feature of *glycogen storage disease type Ib (GSDIb)* (OMIM 232220). *Glycogen storage disease type I* is an inborn error of glycogenolysis and gluconeogenesis with an incidence of 1/100,000 live births. Two major forms of the disease have been identified: *GSDIa*, due to mutations in the glucose-6-phosphate gene, and *GSDIb*, due to mutations in the microsomal glucose-6-phosphate translocase. Both types of the disease share common clinical and biochemical features due to altered glucose homeostasis (hypoglycemia, hyperlactic-acidemia, dyslipidemia, hyperuricemia, liver enlargement and nephropathy). Patients with *GSDIb* also show neutropenia, neutrophil dysfunction, increased frequency of severe infections and inflammatory bowel disease. The identification of such symptoms can help suggest the diagnosis of *GSD type Ib*. Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) is used to restore the neutrophil count, improve neutrophil function and decrease the frequency of infections in *GSDIb* patients, and perhaps improve the intestinal involvement¹⁸.

At present the pathogenesis of neutropenia and neutrophil dysfunction is still unclear but it has been suggested that it could be related to an increased oxidative damage and apoptosis¹⁹. Furthermore the reported ab-

sence of a genotype-phenotype correlation suggests that different genes and proteins modulate neutrophil differentiation, maturation and apoptosis²⁰.

Macrophagic activation syndrome

A macrophagic activation syndrome might suggest a diagnosis of *lysineric protein intolerance* (LPI) (OMM 222700), an autosomal recessive disorder due to a defective transport of cationic amino acids at the basolateral membrane of renal and intestinal epithelial cells.

Classical clinical manifestations are a consequence of the urea cycle defect, due to intracellular ornithine and arginine deficiency. Haematological, renal and pulmonary complications have also been described. Slight normochromic or hypochromic anemia is common. Most patients have leukopenia and the platelet count may be decreased²¹. An involvement of the immune system with macrophagic activation and hemophagocytic lymphohistiocytosis or sea-blue histiocytosis has been reported²² (Fig. 6).

A macrophagic activation syndrome with sea-blue histiocytosis has also been reported to be the presenting sign in rare patients with *Niemann-Pick disease type B*²³.

Megaloblastic anemia

The identification of an early unexplained megaloblastic anemia combined with other typical symptoms, should suggest, among other causes, a diagnosis of an IEM.

Inborn errors of folate and cobalamin absorption, transport and metabolism are characterized by the presence of cellular megaloblastosis and neutrophils with segmented nuclei¹.

Patients with *Imerslund Grasbeck syndrome* (OMIM 261100) usually show megaloblastic anemia between 1 and 5 years of age, and proteinuria. Neurological signs are rare but have been described in older children and late presenters. The Imerslund Grasbeck syndrome is an inherited disorder of cobalamin absorption, with genetic heterogeneity, due to mutations in two different genes (CUBN or AMN), that code for two proteins (cubilin and amnionless) of the complex responsible for the cobalamin-intrinsic factor absorption²⁴.

The experiences reported show that parenteral vitamin B12 treatment improves hematological and neurological symptoms whereas renal damage remains unchanged²⁵. A similar clinical picture has also been reported in the *congenital deficiency of intrinsic factor* (OMIM 261000), that is a different inborn error of cobalamin absorption, due to mutations in the GIF gene²⁶.

Congenital transcobalamin II deficiency (OMIM 275350), an inherited disorder of the cobalamin transport, is characterized by hematological signs (megaloblastic anemia and pancytopenia), agammaglobulinemia, severe atrophy of the intestinal mucosa and neurological involvement. Early diagnosis and specific

treatment with hydroxycobalamin administration may prevent a permanent neurological insult²⁷.

Some inborn errors of cobalamin metabolism are characterized by increased levels of homocysteine and methylmalonic acid. The presence of macrocytic anemia in patients with neurological involvement and vascular thrombotic complications suggests a condition with hyperhomocysteinemia. Different genetic defects have been classified by complementation studies in vitro. Increased plasma total homocysteine, in the absence of methylmalonic aciduria, can be detected in *complementation defects type E and G* (OMIM 236370 and 250940), due to methionine synthase reductase and methionine synthase deficiency, respectively. Both enzymes are involved in the remethylation pathway of homocysteine to methionine. Though most patients show severe neurological involvement, rare cases of mild symptoms and exclusive hematological involvement have also been reported²⁸.

Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria is a genetically heterogeneous disorder of cobalamin metabolism. Few defects cause decreased levels of two coenzymes, adenosylcobalamin and methylcobalamin, and result in decreased activity of the respective enzymes, methylmalonyl-coA mutase and methionine synthase. Different forms of the disorder with similar manifestations have been classified according to complementation groups of cells in vitro: CblC, CblD, CblF (OMIM 277400, 277410 e 277380). Clinical manifestations include neurological involvement associated with metabolic decompensation. Early onset is more common, but late onset has occasionally been reported. Hematological symptoms, including macrocytic anemia, thrombocytopenia or thrombotic microangiopathy, (especially hemolytic uremic syndrome) are constant and can represent the clinical manifestations at onset²⁹. In this respect the measurement of total plasma homocysteine is recommended and an inborn error of cobalamin metabolism should be excluded in all patients with unexplained megaloblastic anemia and thrombotic microangiopathy, even in the absence of neurological involvement.

Although megaloblastic anemia is typical in disorders of cobalamin metabolism while thrombophilic complications are typical in homocystinuria type I, the case of a patient with *homocystinuria type I* who showed megaloblastic anemia at onset has been reported. The pathogenetic mechanism of anemia in such condition could be related to the development of folate deficiency due to the excessive consumption of N5-methyltetrahydrofolate in the methylation of homocysteine to form methionine³⁰. Hematological involvement with megaloblastic anemia has been also reported in the *dihydrofolate reductase deficiency* (OMIM 126060).

Patients with inherited *orotic aciduria* (OMIM 258900) show a megaloblastic anemia, that is unresponsive to vitamin B12 and folic acid, combined with an increased excretion of urinary orotic acid. Phenotypic features include neurological signs, crystalluria, congenital heart defects and immunodeficiency³¹. Orotic

aciduria is an autosomal recessive disorder of pyrimidine synthesis, due to the deficiency of two different proteins (orotic phosphoribosyltransferase and OMP decarboxylase) of a multifunctional enzyme, known as UMP synthase. Clinical manifestations are thought to be due to the pyrimidine depletion. Replacement therapy with oral uridine usually leads to a clinical and haematological remission with reduction in the urinary orotic acid excretion³². Megaloblastic anemia is also a feature of the disease called thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome, which is discussed below.

Sideroblastic anemia

Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome (OMIM 249270) is an autosomal recessive disorder due to mutations in the SLC19A2 gene encoding a thiamine carrier protein³³. Clinical manifestations, including diabetes mellitus and sensorineural deafness, resemble those of some mitochondrialopathies. Hematological involvement includes megaloblastic anemia only responsive to thiamine; the bone marrow shows megaloblastic dyserythropoiesis and ringed sideroblasts. Iron-laden mitochondria in erythroblasts can be detected by electron microscopy.

Among the three major components (hematological involvement, diabetes and deafness) only hematological symptoms are responsive to high doses of thiamine treatment; no effect has been reported with regard to the regression of the sensorineural deafness while conflicting results have been reported on the outcome of diabetes³⁴. *Pearson marrow-pancreas syndrome* (OMIM 557000) is a rare, usually fatal, mitochondrial disorder, involving the hematopoietic system in early infancy, with severe, transfusion dependent anemia. Phenotypic features include exocrine pancreatic dysfunction, variable neutropenia and thrombocytopenia, metabolic acidosis with lactic acidosis and, occasionally, heart involvement and insulin dependent diabetes^{35,36}. Typical vacuolization of erythroblasts and myeloblasts are detected in the bone marrow and iron-specific staining may show the presence of sideroblasts. A differential diagnosis should be considered with the Shwachman syndrome (for the combination of pancreatic and hematological involvement) and should be mainly based on the presence of ringed sideroblasts and vacuolated bone marrow cell precursors in Pearson's syndrome³⁷. *Mitochondriopathies* should be considered in children with persistent unexplained anemia, especially in the presence of an associated lactic acidosis. Due to the severe and often fatal course, the rapid detection of mitochondrial DNA deletions is imperative for diagnosis³⁸.

Hemolytic anemia

In rare patients with *Wilson disease* (OMIM 277900) hemolytic anemia may be the presenting manifestation³⁹. Wilson disease is an autosomal recessive disorder

caused by deficiency in the copper-transporting enzyme, leading to copper accumulation in the liver, brain, kidney and the corneas. Clinical features include hepatic, renal and neurological abnormalities; eye slit-lamp examination reveals the presence of the typical Kayser-Fleischer ring in the cornea. Neurological manifestations are predominant in the classical form, and liver dysfunction is often the initial manifestation in pediatric patients. Nevertheless a minority of patients may present with acute hemolytic crisis and fulminant liver failure. The mechanism of hemolytic crisis is still uncertain and it has been suggested that the release of copper from necrotic liver cells may cause hemolytic anemia.

Acanthocytosis

The term acanthocytosis is used to describe a peculiar spiky appearance of erythrocytes. Acanthocytes are not normally found in the blood and can be associated with at least three hereditary neurological disorders (abetalipoproteinemia, chorea-acanthocytosis, McLeod syndrome) that are generally referred to as neuroacanthocytosis⁴⁰. *Abetalipoproteinemia* (OMIM 200100) is an autosomal recessive condition, due to mutations in the MTP gene encoding the microsomal triglyceride transfer protein. Clinical features are thought to be due to the absence of serum apolipoprotein B containing lipoproteins, leading to fat malabsorption and fat-soluble vitamin deficiency. The main signs consist of progressive spinocerebellar ataxia, peripheral neuropathy and retinitis pigmentosa in association with the peculiar features of the red cells. The abnormal shape of erythrocytes is thought to be due to the altered lipid composition of the plasma membrane. The identification of acanthocytosis in association with neurological symptoms may suggest this diagnosis, leading to early treatment. Vitamin E administration can actually reverse or prevent neurological manifestations.

Thrombophilic complications

Severe degrees of hyperhomocysteinemia associated with homocystinuria are often the result of homozygosity for inborn errors of metabolism in children and young adults.

Severe hyperhomocysteinemia is associated with precocious atherosclerosis and both arterial and venous thrombosis. Thromboembolism, cerebrovascular accidents, peripheral arterial thrombosis and myocardial infarction are complications in patients with *homocystinuria type I*, due to the cystathionine synthase deficiency (OMIM 236200), or with *severe methylentetrahydrofolate reductase deficiency* (OMIM 236250).

In conclusions, hematological involvement may occur in different IEM in association with various typical manifestations. The identification of hematological signs could help suggest the diagnosis, often resulting in early therapeutic intervention.

References

- ¹ De Lonlay P, Fenneteau O, Touati G, Mignot C, Billette de Villemeur T, et al. Hematologic manifestations of inborn errors of metabolism. *Arch Pediatr* 2002;9:822-35.
- ² Grabowski GA, Barton NW, Pastores G, Dambrosia JM, Banerjee TK, McKee, et al. Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannosyl-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann Intern Med* 1995;122:33-9.
- ³ Pastores GM, Weinreb NJ, Aerts H, Andria G, Cox TM, Giralte M, et al. Therapeutic goals in the treatment of Gaucher disease. *Semin Hematol* 2004;41(Suppl 5):4-14.
- ⁴ Beutler E, Grabowski GA. Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill 2001, pp. 3635-3668.
- ⁵ Schuchman EH, Desnick RJ. Niemann-Pick disease type A and B: acid sphingomyelinase deficiencies. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill 2001, pp. 3589-3610.
- ⁶ Patterson MC, Vanier MT, Suzuki K. Niemann-Pick disease types C: a lipid trafficking disorder. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill 2001, pp. 3611-3633.
- ⁷ Andria G, Parenti G. Oligosaccharidoses and related disorders. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM, eds. *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2003, pp. 399-410.
- ⁸ Ikeda K, Goebel HH, Burck U, Kohlschütter A. Ultrastructural pathology of human lymphocytes in lysosomal disorders: a contribution to their morphological diagnosis. *Eur J Pediatr* 1982;138:179-85.
- ⁹ Markesbery WR, Robinson RO, Falace PV, Frye MD. Mucopolysaccharidoses: ultrastructure of leukocyte inclusions. *Ann Neurol* 1980;8:332-6.
- ¹⁰ Strisciuglio P, Sly WS, Dodson WE, McAlister WH, Martin TC. Combined deficiency of beta-galactosidase and neuraminidase: natural history of the disease in the first 18 years of an American patient with late infantile onset form. *Am J Med Genet* 1990;37:573-7.
- ¹¹ Zhou XY, van der Spoel A, Rottier R, Hale G, Willemsen R, Berry GT, et al. Molecular and biochemical analysis of protective protein/cathepsin A mutations: correlation with clinical severity in galactosialidosis. *Hum Mol Genet* 1996;5:1977-87.
- ¹² Olcay L, Gumruk F, Boduroglu K, Coskun T, Tuncbilek E. Anaemia and thrombocytopenia due to haemophagocytosis in a 7-month-old boy with galactosialidosis. *J Inherit Metab Dis* 1998;21:679-80.
- ¹³ Tekinalp G, Aliefendioglu D, Yuce A, Caglar M, Beck M. A case with early infantile form of galactosialidosis with unusual haematological findings. *J Inherit Metab Dis* 1999;22:668-9.
- ¹⁴ Mnif K, Chabchoub A, Marrakchi Z, Ayachi R, Khrouf N. Wolman disease. *Arch Pediatr* 1994;1:663-6.
- ¹⁵ Di Donato S, Garavaglia B, Strisciuglio P, Borroni C, Andria G. Multisystem triglyceride storage disease is due to a specific defect in the degradation of endocellularly synthesized triglycerides. *Neurology* 1988;38:1107-10.
- ¹⁶ Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DA. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill 2001, pp. 2165-2193.
- ¹⁷ Hinson DD, Rogers ZR, Hoffmann GF, Schachte M, Fingerhut R, Kohlschütter A, et al. Hematological abnormalities and cholestatic liver disease in two patients with mevalonate kinase deficiency. *Am J Med Genet* 1998;78:408-12.
- ¹⁸ Visser G, Rake JP, Labrune P, Leonard JV, Moses S, Ullrich K, et al. Consensus guidelines for management of glycogen storage disease type 1b – European Study on Glycogen Storage Disease Type 1. *Eur J Pediatr* 2002;161(Suppl 1):S120-3.
- ¹⁹ Kuipers TW, Maiani NA, Tool AT, Smit GP, Rake JP, Roos D, et al. Apoptotic neutrophils in the circulation of patients with glycogen storage disease type 1b (GSD1b). *Blood* 2003;101:5021-4.
- ²⁰ Melis D, Fulceri R, Parenti G, Marcolongo P, Gatti R, Parini R, et al. Genotype/phenotype correlation in glycogen storage disease type 1b: a multicentre study and review of the literature. *Eur J Pediatr* 2005;164:501-8.
- ²¹ Simell O. Lysinuric protein intolerance and other cationic aminoacidurias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill 2001, pp. 4933-4956.
- ²² Parenti G, Sebastio G, Strisciuglio P, Incerti B, Pecoraro C, Terracciano L, et al. Lysinuric protein intolerance characterized by bone marrow abnormalities and severe clinical course. *J Pediatr* 1995;126:246-51.
- ²³ Candoni A, Grimaz S, Doretto P, Fanin R, Falcomer F, Bembi B. Sea-blue histiocytosis secondary to Niemann-Pick disease type B: a case report. *Ann Hematol* 2001;80:620-2.
- ²⁴ Fyfe JC, Madsen M, Hojrup P, Christensen EI, Tanner SM, de la Chapelle A, et al. The functional cobalamin (vitamin B12)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood* 2004;103:1573-9.
- ²⁵ Broch H, Imerslund O, Monn E, Hovig T, Seip M. Imerslund-Grasbeck anemia. A long-term follow-up study. *Acta Paediatr Scand* 1984;73:248-53.
- ²⁶ Tanner SM, Li Z, Perko JD, Oner C, Cetin M, Altay C, et al. Hereditary juvenile cobalamin deficiency caused by mutations in the intrinsic factor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:4130-3.
- ²⁷ Hall CA. The neurologic aspects of transcobalamin II deficiency. *Br J Haematol* 1992;80:117-20.
- ²⁸ Vilaseca MA, Vilarinho L, Zavadakova P, Vela E, Cleto E, Pineda M, et al. CblE type of homocystinuria: mild clinical phenotype in two patients homozygous for a novel mutation in the MTRR gene. *J Inherit Metab Dis* 2003;26:361-9.
- ²⁹ Francis PJ, Calver DM, Barnfield P, Turner C, Dalton RN, Champion MP. An infant with methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC) presenting with retinal haemorrhages and subdural haematoma mimicking non-accidental injury. *Eur J Pediatr* 2004;163:420-1.
- ³⁰ Gomber S, Dewan P, Dua T. Homocystinuria: a rare cause of megaloblastic anemia. *Indian Pediatr* 2004;41:941-3.
- ³¹ Alvarado CS, Livingstone LR, Jones ME, Ravielle A, McKolanis J, Elsas LJ. Uridine-responsive hypogammaglobulinemia and congenital heart disease in a patient with hereditary orotic aciduria. *J Pediatr* 1988;113:867-71.
- ³² Haggard ME, Lockhart LH. Megaloblastic anemia and orotic aciduria. A hereditary disorder of pyrimidine metabolism responsive to uridine. *Am J Dis Child* 1967;113:733-40.
- ³³ Labay V, Raz T, Baron D, Mandel H, Williams H, Barrett T, et al. Mutations in SLC19A2 cause thiamine-responsive megaloblastic anaemia associated with diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* 1999;22:300-4.
- ³⁴ Valerio G, Franzese A, Poggi V, Tenore A. Long-term follow-up of diabetes in two patients with thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome. *Diabetes Care* 1998;21:38-41.
- ³⁵ Krauch G, Wilichowski E, Schmidt KG, Mayatepek E. Pearson marrow-pancreas syndrome with worsening cardiac function caused by pleiotropic rearrangement of mitochondrial DNA. *Am J Med Genet* 2002;110:57-61.
- ³⁶ Superti-Furga A, Schoenle E, Tuchschild P, Caduff R, Sabato V, De Mattia D, et al. Pearson bone marrow-pancreas syndrome with insulin-dependent diabetes, progressive renal tubulopathy, organic aciduria and elevated fetal haemoglobin caused by deletion and duplication of mitochondrial DNA. *Eur J Pediatr* 1993;152:44-50.

- ³⁷ Favareto F, Caprino D, Micalizzi C, Rosanda C, Boeri E, Mori PG. *New clinical aspects of Pearson's syndrome. Report of three cases.* Haematologica 1989;74:591-4.
- ³⁸ Knerr I, Metzler M, Niemeyer CM, Holter W, Gerecke A, Baumann I, et al. *Hematologic features and clinical course of an infant with Pearson syndrome caused by a novel deletion of mitochondrial DNA.* J Pediatr Hematol Oncol 2003;25:948-51.
- ³⁹ Kitazawa J, Kaizuka M, Kasai M, Noda Y, Takahashi Y, Terui K, et al. *Hemolytic crisis with fulminant hepatic failure in Wilson disease without consanguinity.* Pediatr Int 2004;46:726-9.
- ⁴⁰ Rampoldi L, Danek A, Monaco AP. *Clinical features and molecular bases of neuroacanthocytosis.* J Mol Med 2002;80:475-91.

Lysinuric Protein Intolerance

[Cationic Aminoaciduria]

Authors: Gianfranco Sebastio, MD
Simona Fecarotta, MD
Maria Pia Sperandio, PhD

Posted: 21 December 2006

Summary

Disease characteristics. Lysinuric [protein](#) intolerance (LPI) typically presents after an infant is weaned; variable findings include recurrent vomiting and episodes of diarrhea, episodes of stupor and coma after a protein-rich meal, poor feeding, aversion to protein-rich food, failure to thrive, hepatosplenomegaly, and muscular hypotonia. Over time, findings include: poor growth; osteoporosis; and involvement of the lungs (progressive interstitial changes; rarely, fatal pulmonary alveolar proteinosis), kidneys (progressive glomerular and proximal tubular disease), and bone marrow (normochromic or hypochromic anemia, leukopenia, thrombocytopenia, macrophagic activation syndrome manifest as erythroblastophagocytosis). Hepatic insufficiency and acute pancreatitis can also be seen.

Diagnosis/testing. Plasma ammonia concentration may be elevated after a protein-rich meal. Plasma concentrations of cationic amino acids (lysine, arginine, and ornithine) are usually below normal for age but may be within the normal range. Plasma concentrations of serine, glycine, citrulline, proline, alanine, and glutamine are increased. Urinary orotic acid excretion is frequently increased. Twenty-four-hour urinary excretion of cationic amino acids, especially lysine, is increased. *SLC7A7* is the only [gene](#) currently known to be associated with LPI.

Molecular genetic testing identifies two *SLC7A7* [mutations](#) in approximately 95% of individuals with typical biochemical findings of LPI.

Management. *Treatment of manifestations:* In acute hyperammonemic crises: intravenous administration of arginine chloride and nitrogen scavenger drugs (sodium phenylacetate, sodium benzoate) to block ammonia production; reduction of excess nitrogen in the diet; providing energy as carbohydrates and fat to reduce catabolism. Long-term: dietary [protein](#) restriction; citrulline and oral L-lysine-HCl supplementation; bronchoalveolar lavage to improve respiratory function in persons with pulmonary alveolar proteinosis. *Prevention of primary manifestations:* long-term [protein](#) restriction and administration of citrulline. *Prevention of secondary complications:* varicella immunization in those without previous history of chickenpox or varicella zoster; treatment of those exposed as immune-compromised. *Surveillance:* plasma concentration of amino acids to identify deficiencies of essential amino acids secondary to protein-restricted diet; fasting and postprandial blood ammonia concentrations and attention to signs of hyperammonemia; urinary orotic acid excretion. *Agents/circumstances to avoid:* complete restriction of [protein](#) for more than 24-48 hours.

Testing of relatives at risk: [molecular genetic testing](#) or biochemical testing for early diagnosis and treatment of at-risk sibs.

Genetic counseling. LPI is inherited in an [autosomal recessive](#) manner. At conception, each sib of an [affected](#) individual has a 25% chance of being [affected](#), a 50% chance of being an asymptomatic [carrier](#), and a 25% chance of being [unaffected](#) and not a [carrier](#). [Carrier testing](#) for at-risk family members and [prenatal diagnosis](#) for pregnancies at increased risk are possible using molecular genetic techniques if both [disease-causing mutations](#) have been identified in an [affected](#) family member.

Diagnosis

Clinical Diagnosis

The diagnosis of lysinuric [protein](#) intolerance (LPI) relies on clinical and biochemical findings and, recently, on [molecular genetic testing](#).

LPI typically presents after weaning of breast-fed or formula-fed infants as a variable and nonspecific progressive clinical picture that includes the following:

- Recurrent vomiting with episodes of diarrhea
- Episodes of stupor and coma after a protein-rich meal
- Poor feeding
- Aversion to protein-rich food
- Failure to thrive
- Enlargement of the liver and spleen
- Muscular hypotonia

The diagnosis of LPI is usually not suspected by clinical findings alone and may be missed during infancy and childhood unless the presence of neurologic involvement triggers a diagnostic laboratory evaluation that includes determination of plasma ammonia concentration. In some cases, the diagnosis is established in adulthood. Over time, additional clinical findings appear:

- Poor growth
- Early often severe osteoporosis
- Subclinical or overt pulmonary involvement
- Renal involvement
- Bone marrow involvement

Testing

Biochemical

Testing

For laboratories offering biochemical testing, see [Testing](#).

Affected individuals

- **Plasma ammonia concentration.** Plasma ammonia concentration may be elevated after a protein-rich meal. Fasting values are usually normal.
- **Urinary orotic acid excretion:** Urinary orotic acid excretion is frequently increased.

Note: (1) In some [affected](#) individuals elevated urinary orotic acid excretion occurs in the absence of hyperammonemia. (2) Urinary orotic acid excretion may be within the normal range if an untreated person has had a prolonged fast or has excluded protein-rich food from the diet.

- **Plasma amino acid concentrations**
 - Cationic amino acid (lysine, arginine, and ornithine) concentrations are usually below normal for age, but may be within the normal range.
 - Serine, glycine, citrulline, proline, alanine, and glutamine concentrations are increased.
- **Urinary amino acid excretion.** Twenty-four-hour urinary excretion of cationic amino acids, especially lysine, is increased.

Note: (1) In some [affected](#) individuals, calculation of the renal clearances of cationic amino acids (lysine, arginine, and ornithine) may be necessary to clarify the urinary loss of these amino acids. (2) Renal clearance of an amino acid is calculated using the same formula as for creatinine clearance, but substituting creatinine values with values of 24-hour urinary amino acid excretion and of the fasting plasma amino acid concentrations. (3) Mean values and ranges of the renal clearances of cationic amino acids in individuals with LPI are reported in [Simell \(2001\)](#). (4) Serine, glycine, citrulline, proline, alanine, and glutamine are found in excess in urine but have normal renal clearances.

- **Other**
 - Plasma concentrations of thyroxine-binding globulin (TBG), LDH, and ferritin are usually elevated.
 - Normochromic or hypochromic anemia, leucopenia, and thrombocytopenia are nonspecific hematologic findings.

Carriers. Biochemical analyses cannot be used to determine [carrier](#) status.

Molecular Genetic Testing

GeneReviews designates a molecular genetic test as clinically available only if the test is listed in the GeneTests Laboratory Directory by at least one CLIA-certified laboratory or a clinical laboratory outside the US. GeneTests does not independently verify information provided by laboratories and does not warrant any aspect of a laboratory's work. Listing in GeneTests does not imply that laboratories are in compliance with accreditation, licensure, or patent laws. Clinicians must communicate directly with the laboratories to verify information. —ED.

Gene. *SLC7A7* is the only [gene](#) currently known to be mutated in individuals with LPI [[Borsani et al 1999](#) , [Torrents et al 1999](#)].

Clinical uses

- Diagnostic confirmation
- Carrier testing
- Prenatal testing

Clinical testing

- **Sequence analysis.** Sequence analysis of the *SLC7A7* [gene](#) is available for persons in whom LPI is suspected on the basis of clinical and biochemical findings (see [Biochemical Testing](#)).

The Finnish founder [mutation](#) IVS6-2A>T [previously reported as 1181-2A>T by [Torrents et al \(1999\)](#) and as 1136-2A>T by [Borsani et al \(1999\)](#)] is the only recurrent [mutation](#).

[Table 1](#) summarizes [molecular genetic testing](#) for this disorder.

Table 1. Molecular Genetic Testing Used in Lysinuric Protein Intolerance				
Test Method	Mutations Detected	Mutation Detection Rate ¹		Test Availability
		Two Mutations	One Mutation ²	
Sequence analysis	<i>SLC7A7</i> sequence variants in coding region and splice sites	~95%	~5%	Clinical Testing

1. In individuals whose test results (see [Biochemical Testing](#)) are all consistent with the diagnosis of LPI

2. In a few [affected](#) individuals only one mutant [allele](#) is detected, suggesting the existence of [mutations](#) in [genomic](#) regions not routinely included in the molecular test.

Interpretation of test results. For issues to consider in interpretation of sequence analysis results, click [here](#).

Testing Strategy

If clinical and biochemical findings are suggestive of LPI, the diagnosis can be confirmed by [molecular genetic testing](#) of *SLC7A7*.

- The identification of two mutant [alleles](#) confirms the diagnosis of LPI.
- When only one mutant [allele](#) is detected, clinical and biochemical findings (see [Biochemical Testing](#)) are crucial to the diagnosis of LPI.

Genetically Related (Allelic) Disorders

No other [phenotypes](#) are known to be associated with [mutations](#) of *SLC7A7*.

Clinical Description

Natural History

Usually infants with lysinuric [protein](#) intolerance (LPI) present with gastrointestinal symptoms (feeding difficulties, vomiting, and diarrhea) soon after weaning from breast milk or formula.

Most [affected](#) infants show failure to thrive early in life. Neurologic presentation with episodes of coma is less common. Moderate hepatosplenomegaly is present. Muscular hypotonia and hypotrophy are observed from early infancy. Poor growth and delayed skeletal maturation are common after the first year of life. Osteoporosis may result in pathologic fractures.

Mental development is normal unless episodes of prolonged coma cause neurologic damage.

Classic symptoms of [protein](#) intolerance may remain unnoticed during the first and second decades of life because of subconscious avoidance of dietary [protein](#).

Treatment with a low-protein diet and citrulline supplementation (see [Management](#)) significantly improve symptoms related to the metabolic abnormality. However, some complications, representing the major causes of morbidity and mortality, are not amenable to treatment.

Complications

Lung disease. Progressive interstitial changes in the lung are frequently detected from early years without overt clinical symptoms [[Santamaria et al 1996](#)]. Several [affected](#) individuals of different ethnic origins developed fatal pulmonary alveolar proteinosis (PAP).

PAP usually presents with progressive exertional dyspnea, tachypnea, and cough that are exacerbated by respiratory infections. Hemoptysis is common. Diminished breath sounds, inspiratory crackles, subcostal and suprasternal retractions, cyanosis and, more rarely, digital clubbing can be found on physical examination.

Diffuse reticulonodular densities are common on radiologic evaluation. Chest high-resolution computed tomography reveals ground-glass opacities with superimposed smooth septal thickening.

The pathogenesis of the PAP in LPI is poorly understood.

Renal involvement. Glomerular and tubular involvement is common. [Isolated](#) mild proteinuria is the initial sign of renal disease. Creatinine clearance gradually deteriorates and end-stage renal disease (ESRD) may occur in adulthood.

Renal tubular acidosis or findings consistent with reduced phosphate reabsorption and generalized aminoaciduria indicate underlying complex proximal tubular disease ([Fanconi syndrome](#)) [[Parenti et al 1995](#)].

Kidney histology reveals immune-mediated glomerulonephritis as well as chronic tubulointerstitial nephritis with glomerulosclerosis in the absence of immune deposits.

The pathogenesis of the renal involvement is unknown.

Erythroblastophagocytosis and hematologic complications. Bone marrow abnormalities with macrophagic activation syndrome have been observed in [affected](#) persons of Italian [[Parenti et al 1995](#)], Turkish, and French heritage [[Gursel et al 1997](#) , [Duval et al 1999](#)]. The most common feature is erythroblastophagocytosis. These hematologic complications have not been observed in individuals of Finnish heritage.

Hematologic complications also include slight normochromic or hypochromic anemia, leukopenia, and thrombocytopenia. Decreased megakaryocytes in the bone marrow have been reported.

Subclinical intravascular coagulation and thrombocytopenia responsive to arginine treatment have been reported [[Kayanoki et al 1999](#)].

Autoimmunity and immunologic abnormalities. Several immunologic abnormalities including impaired function of lymphocytes, the presence of lupus erythematosus (LE) cells, antinuclear and anti-DNA antibodies, hypergammaglobulinemia or low serum immune globulin concentrations, and hypocomplementemia have been reported [[Parsons et al 1996](#) , [Dionisi-Vici et al 1998](#)].

Life-threatening varicella infection and increased frequency of common viral and bacterial infections have been reported [[Lukkarinen et al 1998](#)].

Growth, growth hormone (GH) deficiency. Growth retardation is commonly observed in children with LPI and is usually related to [protein](#) malnutrition. In some cases, growth hormone deficiency or arginine depletion causing impaired secretion of growth hormone is observed [[Esposito et al 2006](#)].

Hepatic insufficiency. Hepatic insufficiency has been reported in the terminal phase of the disease in a few individuals. Enlargement of the liver with fatty changes in hepatocytes, micronodular cirrhosis, cholestasis, ascites, and enlargement of the spleen with early esophageal varices were observed at autopsy [[McManus et al 1996](#)].

Pancreatitis. Acute pancreatitis is a life-threatening complication in some persons with LPI [[Parenti et al 1995](#) , [Kamoda et al 1998](#)]. A clear relationship with severe hypertriglyceridemia has not been defined.

Hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. Increased plasma concentrations of cholesterol and triglycerides have been reported. No clear explanation has been proposed for this dyslipidemic state; a higher-carbohydrate diet may contribute to the increased plasma concentration of triglycerides, but it is not sufficient to explain either the hypercholesterolemia or the severe hypertriglyceridemia (triglycerides >1,000 mg/dL or >11 mmol/L).

Pregnancy and childbirth. A Finnish study demonstrated that maternal LPI is associated with increased risk of anemia and toxemia during pregnancy and increased risk of bleeding complications during delivery. Intrauterine growth retardation was noted in a significant number of [unaffected](#) neonates born to mothers with LPI [[Tanner et al 2006](#)].

Pathophysiology. LPI is an inborn error of metabolism caused by defective transport of cationic amino acids at the basolateral membrane of enterocytes and renal tubular cells. Therefore, most of the clinical findings are related to the metabolic abnormality originating from the intracellular depletion of the pool of cationic amino acids. In this respect, hyperammonemia is caused by functional impairment of the urea cycle probably resulting from an intracellular deficiency of ornithine in the liver.

Genotype-Phenotype Correlations

[Genotype-phenotype correlations](#) have not been found.

[Variable expressivity](#) is observed in individuals of Finnish origin who are [homozygous](#) for the same founder [mutation](#).

In a large Italian [pedigree](#), homozygosity for the same [private mutation](#) c.1384_1385insATCA (previously reported as 1670insATCA) gave rise to different clinical presentations: severe short stature with pancreatic and renal involvement in a girl; early pulmonary alveolar proteinosis causing

death in a boy; a very mild clinical presentation in another boy whose brother had a similar clinical picture but died suddenly after a flu-like episode [[Sperandeo et al 2000](#)].

Prevalence

Over 100 individuals with LPI have been reported, almost half of whom are of Finnish origin. The distribution of LPI is worldwide and clusters of [affected](#) individuals have also been found in Southern Italy and Japan. The incidence has been estimated at 1:60,000 newborns in Finland and 1:57,000 in Japan [[Koizumi et al 2000](#)].

A [founder effect](#) for specific [alleles](#) underlies the observed occurrence of LPI in Finland (mutation IVS6-2A>T) and in Japan (mutation p.R410X).

In Italy, LPI is caused by several independent mutational events occurring as [private mutations](#) [[Sperandeo et al 2000](#)].

[Newborn screening](#) in northern Japan revealed a [carrier rate](#) of 1:119 [[Koizumi et al 2000](#)].

Differential Diagnosis

For current information on availability of genetic testing for disorders included in this section, see [GeneTests Laboratory Directory](#). —ED.

The [phenotypic](#) variability of lysinuric [protein](#) intolerance (LPI) has resulted in various misdiagnoses.

Hyperammonemia. Hyperammonemia and clinical manifestations related to it are shared by other metabolic diseases, notably the urea cycle disorders (see [Urea Cycle Disorders Overview](#)). Increased orotic aciduria and hyperexcretion of cationic amino acids help to distinguish LPI from other hyperammonemic conditions.

Lysosomal storage diseases (LSDs). Hepatosplenomegaly, interstitial lung disease, and hematologic manifestation may suggest LSDs such as [Niemann-Pick disease type B](#) and [Gaucher disease](#) [[Parenti et al 1995](#)].

Malabsorptive diseases. The occurrence of gastrointestinal symptoms (e.g., vomiting, diarrhea) as well as of hypoproteinemia and failure to thrive suggests celiac disease. LPI should be included in the differential diagnosis of malabsorptive diseases [[Reinoso et al 1998](#)].

Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Failure to thrive, hepatosplenomegaly, hypertriglyceridemia, increased serum ferritin concentration, anemia, and other blood abnormalities suggest acquired or [familial hemophagocytic lymphohistiocytosis](#).

Autoimmune disorders. Clinical and biochemical findings consistent with diagnosis of an autoimmune disorder such as systemic lupus erythematosus (SLE) were reported in individuals with LPI and, in some cases, were the presenting features.

Management

Evaluations at Initial Diagnosis to Establish the Extent of Disease

- History for evidence of hyperammonemic crises with overt neurologic manifestations (vomiting, drowsiness, coma) and of respiratory involvement (cough, dyspnea, recurrent lower respiratory tract infections)
- Neurologic evaluation to detect secondary neurologic damage
- Respiratory evaluation including chest x-ray, pulmonary high-resolution computed tomography, and function tests
- Evaluation and follow-up of growth parameters
- Liver and spleen ultrasound scans to monitor liver structural changes and spleen enlargement
- Hematologic evaluation (bone marrow aspirate may be required)
- Immunologic assessment including plasma concentrations of immune globulins and, when clinically indicated, detection of autoimmune antibodies and immune complexes
- Renal function studies
- Bone density evaluation

Treatment of Manifestations

The management of individuals with LPI is similar to that described in [urea cycle disorders](#). In LPI, the severity of hyperammonemic crises rarely requires extreme treatments such as dialysis. It is recommended that individuals with LPI be cared for by a specialized metabolic team.

Treatment of Acute Hyperammonemic Crises

Pharmacologic management. Blocking the production of ammonia is accomplished by the intravenous administration of arginine chloride and a combination of the nitrogen scavenger drugs sodium phenylacetate and sodium benzoate. An intravenous loading dose is followed by an oral maintenance dose when the individual is stable. A detailed protocol for the treatment of intercurrent hyperammonemia in individuals with urea cycle disorders was designed by [Brusilow & Horwich \(2001\)](#).

Reducing the amount of excess nitrogen in the diet and reducing catabolism through the introduction of energy supplied by carbohydrates and fat. In acutely ill individuals, energy should be provided as carbohydrate and fat, either intravenously as glucose and Intralipid® or orally as protein-free formula.

Patients should be transitioned from parenteral to enteral feeds as soon as possible. Nasogastric tube feeding may be required to ensure adequate caloric and nutritional intake. Therapy with ondansetron should be started to decrease vomiting.

Complete restriction of [protein](#) for more than 24-48 hours is not recommended as the individual will become [protein](#) catabolic for essential amino acids.

Long-Term Treatment

Dietary [protein](#) restriction and citrulline supplementation. Current treatment consists of dietary [protein](#) restriction (1.0-1.5 g/kg/day in children and 0.5-0.7 g/kg/day in adults) and supplementation with citrulline (2.5-8.5 g/day, in 3-5 doses taken with meals). Citrulline dosage should be adjusted

according to the individual's clinical and biochemical response [[Simell 2001](#)]. The lowest effective dosage of citrulline should be established to avoid an overload.

Measurement of orotic aciduria appears to be a sensitive tool to adjust the treatment.

Lysine supplementation. As lysine deficiency may contribute to the development of pathologic signs in LPI, oral supplementation with L-lysine-HCl should be attempted. Taking into account the defective intestinal absorption of lysine in LPI, small doses of L-lysine-HCl (0.05-0.5 mmol/kg, 3x/day) are given and may normalize plasma lysine concentrations [[Lukkarinen et al 2003](#)].

Additional Therapies

Modification of the diet and [fish](#) oil supplementation should be tried in individuals with dyslipidemia before pharmacologic treatment of dyslipidemia is started.

Hypocarnitinemia has been reported in a few individuals with LPI [[Korman et al 2002](#)]; determination of plasma carnitine concentrations may help prevent symptomatic functional carnitine deficiency.

Treatment of Late Complications

While hyperammonemia can be efficiently prevented and treated, no effective therapy has been established for late complications.

Treatment of lung disease in LPI remains controversial: high-dose corticosteroid treatment was effective in a few patients when started early, whereas no response was noted in others.

In individuals with PAP, respiratory function can be improved by bronchoalveolar lavage. However, relapses are common, requiring further lavage, which eventually becomes ineffective [[Simell 2001](#) , [Santamaria et al 2004](#)].

Heart-lung transplantation was attempted with a temporary successful result, but it did not prevent a fatal return of the lung disease [[Santamaria et al 2004](#)].

Bone marrow transplantation has been discussed as a possible treatment for PAP in LPI. The rationale of this therapeutic approach would rely on the hypothesis of a defective function of lung macrophages.

Prevention of Primary Manifestations

The prevention of metabolic abnormality is the goal of the treatment. Long-term management is based on protein-restricted diet and administration of citrulline (see [Treatment of Manifestations](#)).

Prevention of Secondary Complications

The onset and the clinical course of the secondary complications, such as lung and renal involvement, seem to be poorly influenced by early treatment.

Efforts to minimize the risk of respiratory infections should be promoted.

Individuals with LPI without previous history of chickenpox or varicella zoster should be vaccinated or, if exposed to varicella, should be treated as immune-compromised [[Lukkarinen et al 1998](#)].

Some individuals with LPI may respond poorly to polysaccharide-containing vaccines. Therefore, revaccination may be required if specific antibody titers are non-protective.

Surveillance

Individuals with LPI should be referred for follow-up to physicians with expertise in the treatment of inborn errors of metabolism. The age of the patient and the severity of the clinical features determines the frequency of clinical visits and monitoring.

Monitoring should include the following:

- Plasma concentrations of amino acids to identify deficiencies of essential amino acids induced by the protein-restricted diet (similar to that used in [urea cycle disorders](#))
- Attention to early signs of hyperammonemia such as lethargy, nausea, vomiting, poor feeding in young children, and headache and mood changes in older children
- Fasting and postprandial blood ammonia concentrations
- Urinary orotic acid excretion
- Serum concentrations of LDH and ferritin

The development of a multiorgan pathology in LPI requires careful surveillance of several complications such as lung and renal diseases and osteoporosis. No specific guidelines have been proposed. Therefore, a tailored approach is necessary for the follow-up of a specific complication.

Agents/Circumstances to Avoid

Large boluses of [protein](#) or amino acids should be avoided.

It is not clear whether prolonged fasting may trigger hyperammonemic crises.

Testing of Relatives at Risk

It is appropriate to offer [molecular genetic testing](#) to at-risk sibs if the [disease-causing mutations](#) are identified in an [affected](#) family member so that morbidity and mortality can be reduced by early diagnosis and treatment.

When [molecular testing](#) is not available, early diagnosis of at-risk sibs relies upon careful clinical evaluation and determination of plasma and urinary amino acid concentrations and orotic acid urinary excretion.

See [Genetic Counseling](#) for issues related to testing of at-risk relatives for genetic counseling purposes.

Therapies Under Investigation

Sodium-phenylbutyrate. To avoid unknown risks from high doses of citrulline supplementation, sodium-phenylbutyrate (450 mg/kg/day divided into 4 doses at meals) can be added to the treatment. Meanwhile, careful reduction of citrulline supplementation (from one-half to one-third of

the conventional dosage) can be introduced but needs to be monitored by measurement of concentrations of blood ammonia and urine orotic acid.

Alendronate. Osteopenia leading to osteoporosis is a major feature of LPI. Many individuals with LPI show osteopenia or osteoporosis despite treatment. Treatment with alendronate has recently been attempted in a child with LPI [[Gomez et al 2006](#)].

Search ClinicalTrials.gov for access to information on clinical studies for a wide range of diseases and conditions.

Other

No treatment, including strict compliance with dietary regimen, citrulline supplementation, or high-dose corticosteroids, is effective in influencing the clinical course of the renal disease.

Genetic Counseling

Genetic counseling is the process of providing individuals and families with information on the nature, inheritance, and implications of genetic disorders to help them make informed medical and personal decisions. The following section deals with genetic risk assessment and the use of family history and genetic testing to clarify genetic status for family members. This section is not meant to address all personal, cultural, or ethical issues that individuals may face or to substitute for consultation with a genetics professional. To find a genetics or prenatal diagnosis clinic, see the [GeneTests Clinic Directory](#). —ED.

Mode of Inheritance

Lysinuric [protein](#) intolerance (LPI) is inherited in an [autosomal recessive](#) manner.

Risk to Family Members

Parents of a [proband](#)

- The parents of an [affected](#) child are [obligate heterozygotes](#) and therefore carry one mutant [allele](#).
- Heterozygotes (carriers) are asymptomatic.

Sibs of a [proband](#)

- At conception, each sib of an [affected](#) individual has a 25% chance of being [affected](#), a 50% chance of being an asymptomatic [carrier](#), and a 25% chance of being [unaffected](#) and not a [carrier](#).
- Once an at-risk sib is known to be [unaffected](#), the risk of his/her being a [carrier](#) is 2/3.
- Heterozygotes (carriers) are asymptomatic.

Offspring of a [proband](#). The offspring of an individual with LPI are [obligate heterozygotes](#) (carriers) for a [disease-causing mutation](#) in *SLC7A7*.

Other family members of a [proband](#). Each sib of the proband's parents is at 50% risk of being a [carrier](#).

Carrier Detection

Molecular genetic testing. Carrier testing for at-risk family members using molecular genetic techniques is available once the [mutations](#) have been identified in the [proband](#).

Biochemical genetic testing. Biochemical tests, e.g. plasma concentration of amino acids or urinary excretion of orotic acid, cannot distinguish [carriers](#) from controls.

Related Genetic Counseling Issues

Family planning. The optimal time for determination of genetic risk, clarification of [carrier](#) status, and discussion of the availability of [prenatal testing](#) is before pregnancy.

DNA banking. DNA banking is the storage of [DNA](#) (typically extracted from white blood cells) for possible future use. Because it is likely that testing methodology and our understanding of [genes](#), [mutations](#), and diseases will improve in the future, consideration should be given to banking [DNA](#) of [affected](#) individuals. [DNA banking](#) is particularly relevant in situations in which the [sensitivity](#) of currently available testing is less than 100%. See [DNA Banking](#) for a list of laboratories offering this service.

Prenatal Testing

[Prenatal diagnosis](#) for pregnancies at increased risk is possible by analysis of [DNA](#) extracted from fetal cells obtained by amniocentesis usually performed at about 15-18 weeks' gestation or chorionic villus sampling (CVS) at about ten to 12 weeks' gestation. Both disease-causing [alleles](#) of an [affected](#) family member must be identified before [prenatal testing](#) can be performed.

Note: Gestational age is expressed as menstrual weeks calculated either from the first day of the last normal menstrual period or by ultrasound measurements.

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) may be available for families in which the [disease-causing mutations](#) have been identified in an [affected](#) family member. For laboratories offering PGD, see [Testing](#)

Molecular Genetics

Information in the Molecular Genetics tables may differ from that in the text; tables may contain more recent information. —ED.

Molecular Genetics of Lysinuric Protein Intolerance		
Gene Symbol	Chromosomal Locus	Protein Name
<i>SLC7A7</i>	14q11.2	Y+L amino acid transporter 1

Data are compiled from the following standard references: Gene symbol from [HUGO](#); chromosomal locus, locus name, critical region, complementation group from [OMIM](#); protein name from [Swiss-Prot](#).

[OMIM](#) Entries for Lysinuric Protein Intolerance

222700	LYSINURIC PROTEIN INTOLERANCE; LPI
603593	SOLUTE CARRIER FAMILY 7, MEMBER 7; SLC7A7

Genomic Databases for Lysinuric Protein Intolerance					
Gene Symbol	Entrez Gene	HGMD	GeneCards	GDB	GenAtlas
<i>SLC7A7</i>	603593	SLC7A7	SLC7A7	9863033	SLC7A7

For a description of the genomic databases listed, click [here](#).

Note: HGMD requires registration.

Normal allelic variants: The *SLC7A7* [gene](#) has 11 [exons](#) and is 46.5 kbp in length.

Pathologic allelic variants: At least 30 *SLC7A7* [mutations](#) have been described as causing lysinuric protein intolerance (LPI) [[Borsani et al 1999](#) , [Torrents et al 1999](#) , [Sperandeo et al 2000](#) , [Palacin et al 2001](#) , [Shoji et al 2002](#) , [Sperandeo 2005](#)]. Apart from the Finnish founder [mutation](#) IVS6-2A>T, most other [mutations](#) are private; they include missense and [nonsense mutations](#), [deletions](#), [insertions](#), and [splicing mutations](#).

Normal [gene](#) product: The *SLC7A7* [gene](#) encodes the Y+L amino acid transporter 1 (y⁺LAT-1) protein; y⁺LAT-1 is linked by a disulfide bond to solute [carrier](#) family 3 member 2 (SLC3A2, also known as 4F2hc), which represents the heavy chain subunit of the heterodimeric amino acid transporter defective in LPI. This transporter, located at the basolateral membrane of epithelial cells, induces a *system y⁺L* activity, one of four mechanisms for cationic amino acid transport in mammalian tissues.

Abnormal [gene](#) product: Expression studies in *X. laevis oocytes* demonstrated that most of the *SLC7A7* [mutations](#) abolish y⁺L activity.

Resources

GeneReviews provides information about selected national organizations and resources for the benefit of the reader. *GeneReviews* is not responsible for information provided by other organizations. -ED.

- National Urea Cycle Disorders Foundation**
 4841 Hill Street
 La Canada CA 91011
Phone: 800-38NUCDF (800-386-8233)
Fax: 818-790-2460
Email: info@nucdf.org
www.nucdf.org
- Children Living with Inherited Metabolic Diseases (CLIMB)**
 Climb Building
 176 Nantwich Road
 Crewe CW2 6BG

United Kingdom
Phone: 0800 652 3181 (toll free)
Email: info.svcs@climb.org.uk
www.climb.org.uk

 [Resources Printable Copy](#)

References

[PubMed](#)

Published Statements and Policies Regarding Genetic Testing

No specific guidelines regarding genetic testing for this disorder have been developed.

Literature Cited

- Borsani G, Bassi MT, Sperandio MP, De Grandi A, Buoninconti A, Riboni M, Manzoni M, Incerti B, Pepe A, Andria G, Ballabio A, Sebastio G (1999) SLC7A7, encoding a putative permease-related [protein](#), is mutated in patients with lysinuric [protein](#) intolerance. *Nat Genet* 21:297-301 [[Medline](#)]
- Brosilow SW and Horwich AL (2001). Urea cycle enzymes. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle DT (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp 1909-63
- Dionisi-Vici C, De Felice L, el Hachem M, Bottero S, Rizzo C, Paoloni A, Goffredo B, Sabetta G, Caniglia M (1998) Intravenous immune globulin in lysinuric [protein](#) intolerance. *J Inherit Metab Dis* 21:95-102 [[Medline](#)]
- Duval M, Fenneteau O, Doireau V, Faye A, Emilie D, Yotnda P, Drapier JC, Schlegel N, Sterkers G, de Baulny HO, Vilmer E (1999) Intermittent hemophagocytic lymphohistiocytosis is a regular feature of lysinuric [protein](#) intolerance. *J Pediatr* 134:236-9 [[Medline](#)]
- Esposito V, Lettierio T, Fecarotta S, Sebastio G, Parenti G, Salerno M (2006) Growth hormone deficiency in a patient with lysinuric [protein](#) intolerance. *Eur J Pediatr* 165:763-6 [[Medline](#)]
- Gomez L, Garcia-Cazorla A, Gutierrez A, Artuch R, Varea V, Martin J, Pinillos S, Vilaseca MA (2006) Treatment of severe osteoporosis with alendronate in a patient with lysinuric [protein](#) intolerance. *J Inherit Metab Dis* 29:687 [[Medline](#)]
- Gursel T, Kocak U, Tumer L, Hasanoglu A (1997) Bone marrow hemophagocytosis and immunological abnormalities in a patient with lysinuric [protein](#) intolerance. *Acta Haematol* 98:160-2 [[Medline](#)]
- Kamoda T, Nagai Y, Shigeta M, Kobayashi C, Sekijima T, Shibasaki M, Nakamura N (1998) Lysinuric [protein](#) intolerance and systemic lupus erythematosus. *Eur J Pediatr* 157:130-1 [[Medline](#)]
- Kayanoki Y, Kawata S, Yamasaki E, Kiso S, Inoue S, Tamura S, Taniguchi N, Matsuzawa Y (1999) Reduced nitric oxide production by L-arginine deficiency in lysinuric [protein](#) intolerance exacerbates intravascular coagulation. *Metabolism* 48:1136-40 [[Medline](#)]

- Koizumi A, Shoji Y, Nozaki J, Noguchi A, E X, Dakeishi M, Ohura T, Tsuyoshi K, Yasuhiko W, Manabe M, Takasago Y, Takada G (2000) A cluster of lysinuric [protein](#) intolerance (LPI) patients in a northern part of Iwate, Japan due to a [founder effect](#). The Mass [Screening](#) Group. *Hum Mutat* 16:270-1 [[Medline](#)]
- Korman SH, Raas-Rothschild A, Elpeleg O, Gutman A (2002) Hypocarnitinemia in lysinuric [protein](#) intolerance. *Mol Genet Metab* 76:81-3 [[Medline](#)]
- Lukkarinen M, Nanto-Salonen K, Pulkki K, Aalto M, Simell O (2003) Oral supplementation corrects plasma lysine concentrations in lysinuric [protein](#) intolerance. *Metabolism* 52:935-8 [[Medline](#)]
- Lukkarinen M, Nanto-Salonen K, Ruuskanen O, Lauteala T, Sako S, Nuutinen M, Simell O (1998) Varicella and varicella immunity in patients with lysinuric [protein](#) intolerance. *J Inherit Metab Dis* 21:103-11 [[Medline](#)]
- McManus DT, Moore R, Hill CM, Rodgers C, Carson DJ, Love AH (1996) Necropsy findings in lysinuric [protein](#) intolerance. *J Clin Pathol* 49:345-7 [[Medline](#)]
- Palacin M, Borsani G, Sebastio G (2001) The molecular bases of cystinuria and lysinuric [protein](#) intolerance. *Curr Opin Genet Dev* 11:328-35 [[Medline](#)]
- Parenti G, Sebastio G, Strisciuglio P, Incerti B, Pecoraro C, Terracciano L, Andria G (1995) Lysinuric [protein](#) intolerance characterized by bone marrow abnormalities and severe clinical course. *J Pediatr* 126:246-51 [[Medline](#)]
- Parsons H, Snyder F, Bowen T, Klassen J, Pinto A (1996) Immune complex disease consistent with systemic lupus erythematosus in a patient with lysinuric [protein](#) intolerance. *J Inherit Metab Dis* 19:627-34 [[Medline](#)]
- Reinoso MA, Whitley C, Jessurun J, Schwarzenberg SJ (1998) Lysinuric [protein](#) intolerance masquerading as celiac disease: a case report. *J Pediatr* 132:153-5 [[Medline](#)]
- Santamaria F, Brancaccio G, Parenti G, Francalanci P, Squitieri C, Sebastio G, Dionisi-Vici C, D'argenio P, Andria G, Parisi F (2004) Recurrent fatal pulmonary alveolar proteinosis after heart-lung transplantation in a child with lysinuric [protein](#) intolerance. *J Pediatr* 145:268-72 [[Medline](#)]
- Santamaria F, Parenti G, Guidi G, Rotondo A, Grillo G, Larocca MR, Celentano L, Strisciuglio P, Sebastio G, Andria G (1996) Early detection of lung involvement in lysinuric [protein](#) intolerance: role of high-resolution computed tomography and radioisotopic methods. *Am J Respir Crit Care Med* 153:731-5 [[Medline](#)]
- Shoji Y, Noguchi A, Shoji Y, Matsumori M, Takasago Y, Takayanagi M, Yoshida Y, Ihara K, Hara T, Yamaguchi S, Yoshino M, Kaji M, Yamamoto S, Nakai A, Koizumi A, Hokezu Y, Nagamatsu K, Mikami H, Kitajima I, Takada G (2002) Five novel SLC7A7 variants and y+L gene-expression pattern in cultured lymphoblasts from Japanese patients with lysinuric [protein](#) intolerance. *Hum Mutat* 20:375-81 [[Medline](#)]
- Simell O (2001) Lysinuric [protein](#) intolerance and other cationic aminoacidurias In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle DT (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp 4933-56

- Sperandeo MP, Annunziata P, Ammendola V, Fiorito V, Pepe A, Soldovieri MV, Tagliatela M, Andria G, Sebastio G (2005) Lysinuric [protein](#) intolerance: identification and functional analysis of [mutations](#) of the SLC7A7 [gene](#). *Hum Mutat* 25:410 [[Medline](#)]
- Sperandeo MP, Bassi MT, Riboni M, Parenti G, Buoninconti A, Manzoni M, Incerti B, Larocca MR, Di Rocco M, Strisciuglio P, Dianzani I, Parini R, Candito M, Endo F, Ballabio A, Andria G, Sebastio G, Borsani G (2000) Structure of the SLC7A7 [gene](#) and [mutational analysis](#) of patients [affected](#) by lysinuric [protein](#) intolerance. *Am J Hum Genet* 66:92-9 [[Medline](#)]
- Tanner L, Nanto-Salonen K, Niinikoski H, Erkkola R, Huoponen K, Simell O (2006) Hazards associated with pregnancies and deliveries in lysinuric [protein](#) intolerance. *Metabolism* 55:224-31 [[Medline](#)]
- Torrents D, Mykkanen J, Pineda M, Feliubadalo L, Estevez R, de Cid R, Sanjurjo P, Zorzano A, Nunes V, Huoponen K, Reinikainen A, Simell O, Savontaus ML, Aula P, Palacin M (1999) Identification of SLC7A7, encoding y+LAT-1, as the lysinuric [protein](#) intolerance [gene](#). *Nat Genet* 21:293-6 [[Medline](#)]

Suggested Readings

- Brosnan ME, Brosnan JT (2004) Renal arginine metabolism. *J Nutr* 134:2791-2795 [[Medline](#)]
- Palacin M, Nunes V, Font-Llitjos M, Jimenez-Vidal M, Fort J, Gasol E, Pineda M, Feliubadalo L, Chillaron J, Zorzano A (2005) The genetics of heteromeric amino acid transporters. *Physiology (Bethesda)* 20:112-24 [[Medline](#)]
- Simell O (modified 2002) Lysinuric [protein](#) intolerance and other cationic aminoacidurias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Vogelstein B (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (OMMBID)*, McGraw-Hill, New York, Chap 192. www.ommbid.com

Author Information

Gianfranco Sebastio, MD
Associate Professor of Pediatrics
Director, Pediatric Genetics Unit
Department of Pediatrics
Federico II University
Naples, Italy

Simona Fecarotta, MD
Department of Pediatrics
Federico II University
Naples, Italy

Maria Pia Sperandeo, PhD
Department of Pediatrics
Federico II University
Naples, Italy

Acknowledgments

Supported by grants from EUGINDAT EC FPVI (LSHM-CT-2003-502852) and MURST, Rome, COFIN 2005

Revision History

- 21 December 2006 (me) Review posted to live Web site
- 22 September 2006 (gs) Original submission

[Contact](#)
[GeneTests](#)

[Copyright©](#) 1993-2007, All Rights Reserved
University of Washington, Seattle
[Terms of Use](#)

[Funding Support](#)
National Library of Medicine, [NIH](#)
National Human Genome Research Institute, [NIH](#)

[Sponsoring Institution](#)
[University of Washington](#)
Seattle, Washington